

**Der Proteinase-aktivierte Rezeptor 2 beeinflusst die
Migration von Cholangiokarzinomzellen über eine
Wechselwirkung mit dem Hepatozyten-
Wachstumsfaktor-Rezeptor Met**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt vor dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Alexander Hascher
geboren am 1.4.1981 in Plauen

Gutachter

1. Prof. Dr. Utz Settmacher, Jena
2. PD Dr. Martin Westermann, Jena
3. Prof. Dr. Hendrik Ungefroren, Lübeck

Tag der öffentlichen Verteidigung: 3. Juni 2014

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
AK	Antikörper
Akt/PKB	Onkogene, die für die Proteinkinase B kodieren
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
Blotto	Blocklösung für Nitrozellulosemembranen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Ca ²⁺	Kalzium
CA 19-9	Carbohydrat-Antigen (Tumormarker)
Cbl	Casitas B-lineage lymphoma-Protein (E3 Ubiquitin-Protein Ligase)
CCC	Cholangiokarzinom (Cholangiozelluläres Karzinom)
CCC-787	Cholangiokarzinom-787-Primärkultur (die in dieser Arbeit verwendete Primärkultur)
CD44	Cluster of differentiation 44 - Antigen, ein Glyko- protein
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEA	Carcinoembryonales Antigen (Tumormarker)
CRK	CT10 Regulator of Kinase
CRKL	CRK-ähnlich
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Verzeichnis der Abkürzungen

ErbB2	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2/neu)
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	EGF-Rezeptor
EK	Endkonzentration
ERC	endoskopische retrograde Cholangiographie
ERCP	endoskopische retrograde Cholangio-Pankreatikographie
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
Fa.	Firma
FAS	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
FKS	fetales Kälberserum
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein
GDP	5'-Guanosindiphosphat
ggf.	gegebenenfalls
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRB2	wachstumsfaktorenrezeptor-gebundenes Protein 2
GRK	G-Protein-Rezeptor-Kinase
GTP	5'-Guanosintriphosphat
GTPase	5'-Guanosintriphosphatase
h	Stunde
HaCaT-Keratinozyten	humane Keratinozyten-Zelllinie
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HGF/SF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor/scatter factor
HRP	Meerrettich-Peroxidase
ICL	intrazellulärer Loop
IgG	Immunglobulin G
IP3	Inositoltrisphosphat (Inositol-1,4,5-trisphosphat)
IPT	Immunglobulin-Plexin-Transkriptionsfaktor-Domäne

Verzeichnis der Abkürzungen

K1, K2, K3, K4	Kringle-Domänen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAR	(Leukocyte antigen-related)-Tyrosinphosphatase
M	molar (mol/l)
MAP-Kinase	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAP/ERK-Kinase
Met	HGF-Rezeptor
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar (mmol/l)
MRC	Magnetresonanz-Cholangiografie
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikografie
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomografie
MW Marker	Molekulargewichtsmarker
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar (µmol/l)
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' von aktivierten B-Zellen (Transkriptionsfaktor)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
P	Phosphat
P2pal-18S	selektiver PAR ₂ -Antagonist (palmitoyl- RSSAMDENSEKKRKSAIK-NH ₂)
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PAR	Proteinase-aktivierter Rezeptor
PAR	Proteinase-aktivierter Rezeptor, Subtyp 2
PAR ₂ -AK	gegen PAR ₂ gerichteter Antikörper
PAR ₂ -AP	PAR ₂ -aktivierendes Peptid

Verzeichnis der Abkürzungen

PAR ₂ -RP	PAR ₂ reverse peptide (inaktives Kontroll-Peptid)
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Wachstumsfaktor (Platelet Derived Growth Factor)
PDGFR	PDGF-Rezeptor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSI	Plexin-Semaphorin-Integrin-Domäne
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PTP1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B
Ras	Protoonkogen (Rat sarcoma)
Raf	Proteinkinase (rapidly accelerated fibrosarcoma)
RNA	Ribonukleinsäure
RON	Tyrosinkinaserzeptor (Recepteur d'origine nantais)
RPMI-1640	Zellkulturmedium (entwickelt vom Roswell Park Memorial Institute)
RP-P2pal-18S	inaktives Kontrollpeptid für den PAR ₂ -Antagonisten P2-Pal-18S
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sema	Semaphorin
Ser	Serin
SF	Scatter factor (Met-Ligand)
SHC	src homology 2 domain containing

Verzeichnis der Abkürzungen

SHIP-2	Src homology 2 domain-containing Inositol 5'-Phosphatase 2
sog.	so genannt
Src	Tyrosin-Proteinkinase (Akronym aus <u>Sar</u> coma)
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered saline-buffer
TBS-T	Tris-buffered saline-buffer + Tween
TCPTP	T-cell protein tyrosine phosphatase
Temed	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TF	tissue factor
Tfl	Thermus flavus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
u. a.	unter anderem
UICC	Union internationale contre le cancer
UK Jena	Universitätsklinikum Jena
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV-VIS	ultraviolett / sichtbar
V	Volt
V.	Vena / Vene
v. a.	vor allem
v-crk	Virus CT10 Regulator of Kinase (isoliert aus dem Vogelgrippestamm CT10)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor
Vol.-%	Volumenprozent
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z. B.	zum Beispiel
° C	Grad Celsius

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1)** Aktivierung von PAR₂ durch zwei verschiedene Mechanismen
- Abb. 2)** G-Protein- und β -Arrestin-abhängiges Singaling des Systems
TF-VIIa-PAR₂ in Zellen der Tumormikroumgebung
- Abb. 3)** Domänenstruktur von a) Met und b) seines Liganden HGF
- Abb. 4)** Schematische Darstellung des intrazellulären Netzwerks der RTK Met
- Abb. 5)** Nachweis von PAR₂ in CCC-787-Zellen auf RNA-Level
- Abb. 6)** PAR₂ vermittelt in CCC-787-Zellen einen migratorischen Effekt
- Abb. 7)** Die Met-Inhibitoren SU 11274 und PHA 665752 hemmen den Effekt
von Trypsin und PAR₂-AP auf die Migration von CCC-787-Zellen
- Abb. 8)** PAR₂ vermittelt in CCC-787-Zellen eine Met-Aktivierung
- Abb. 9)** Arbeitsmodell für die PAR₂-vermittelte migratorische Signalweiterleitung
in CCC-787-Zellen

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung.....	4
2.1 Das Cholangiokarzinom	4
2.2 Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PARs)	9
2.2.1 Der Proteinase-aktivierte Rezeptor 2	10
2.2.1.1 Struktur	10
2.2.1.2 Aktivierungsmechanismus.....	10
2.2.1.3.1 G-Protein-Kopplung	11
2.2.1.3.2 Heterotrimere G-Proteine	12
2.2.1.4 Signaltransduktion.....	13
2.2.1.5 Inaktivierung.....	14
2.2.1.6 Funktionen	15
2.2.1.7 PAR ₂ und Karzinogenese.....	16
2.3 Die Rezeptortyrosinkinase Met	17
2.3.1 Struktur	18
2.3.2 Aktivierung	20
2.3.3 Signalweiterleitung/Signalterminierung	20
2.3.4 Funktionen	22
2.3.5 Met und Tumorentstehung und -progression	22
3. Zielstellung	24
4. Materialien und Methoden	25
4.1 Materialien	25
4.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien.....	25

Inhaltsverzeichnis

4.1.2 Rezeptoragonisten und -antagonisten	29
4.1.3. Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien.....	30
4.1.4. Geräte	32
4.2 Methoden	34
4.2.1 Die CCC-Primärkultur 787	34
4.2.1.1 Kultivierung der Zellen	35
4.2.1.2 Einfrieren von Zellen, Kryokonservierung	35
4.2.1.3 Auftauen der Zellen.....	36
4.2.2 Zellzahlbestimmung	36
4.2.3. Gesamt-RNA-Isolation	36
4.2.4 RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese.....	36
4.2.5 Chemotaktische Migration.....	37
4.2.6 Statistische Auswertung der Migrationsdaten	38
4.2.7 Präparation von CCC-787-Zelllysaten.....	38
4.2.8 Proteinbestimmung	39
4.2.9 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	40
4.2.10 Bestimmung von p-Met mittels Western Blotting.....	40
4.2.11 Membran-Stripping und Met-Blotting.....	41
4.2.12 Quantifizierung der Blot-Daten	41
5. Ergebnisse.....	42
5.1 PAR ₂ -Nachweis in CCC-787-Zellen	42
5.2 Die Serinproteinase Trypsin und das selektiv PAR ₂ -aktivierende Peptid 2-furoyl-LIGRLO-NH ₂ stimulieren die Migration von CCC-787-Zellen, der PAR ₂ - Antagonist P2pal-18S hemmt diesen Effekt.....	43
5.3 Eine Inhibierung der RTK Met hemmt die Trypsin- sowie 2-furoyl- LIGRLO-NH ₂ -induzierte Steigerung der Migration von CCC-787-Zellen.....	45

Inhaltsverzeichnis

5.4 Trypsin und das PAR ₂ -AP 2-furoyl-LIGRLO-NH ₂ induzieren in CCC-787-Zellen eine Aktivierung von Met	46
6. Diskussion	48
7. Schlussfolgerung	52
8. Literaturverzeichnis.....	53
Anhang	78

1. Zusammenfassung

Trotz jüngster Fortschritte sind die therapeutischen Möglichkeiten für zahlreiche Karzinome immer noch unzureichend und daher neue Ansätze weiterhin dringend erforderlich. Eine wesentliche Voraussetzung dafür bietet eine detaillierte Aufklärung der spezifischen molekularen Mechanismen von Entstehung und Ausbreitung der jeweiligen Tumorentität. Derartige Untersuchungen betreibt man international intensiv mit dem Ziel, um daraus neue, spezifische Ansatzpunkte für systemische Therapieprinzipien abzuleiten. Dieser Strategie folgend konnten innerhalb der letzten Jahre auch für die Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PARs), eine kleine, aus vier Subtypen (PAR₁–PAR₄) bestehende Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Hinweise für eine Funktion in verschiedenen epithelialen Tumorarten erarbeitet werden. Dies betrifft auch das hepatozelluläre Karzinom, für das unsere Arbeitsgruppe vor Kurzem u. a. zeigen konnte, dass ein Mitglied der PAR-Familie, PAR₂, ein Rezeptor für Trypsin, Faktor Xa, Kallikreine und verschiedene weitere Serinproteinasen, in HCC-Zellen einen migratorischen/invasiven Effekt vermittelt und dabei neben p42/p44-MAP-Kinasen auch die Rezeptortyrosinkinase Met als ein wesentliches Effektorsystem im migratorisch-invasiven Signaling von PAR₂ in dieser Karzinomzellart fungiert. Da eine erhöhte migratorisch-invasive Kapazität von Tumorzellen eine wesentliche Voraussetzung für die Progression eines Tumors darstellt, wurde eine diesbezügliche regulatorische Funktion von PAR₂-Met-Signaling für das HCC abgeleitet.

Vor diesem Hintergrund war zu vermuten, dass auch in anderen epithelialen Tumorarten ein derartiger PAR₂-Met-Rezeptor-Crosstalk-Mechanismus vorkommt und dieser an der Regulation der Zellmigration beteiligt ist. Dabei war es besonders interessant dies zunächst an einem weiteren Karzinom der Leber, dem Cholangiokarzinom, zu untersuchen. Das CCC stellt mit einer jährlichen Inzidenz von 1–3 Fällen pro 100 000 Einwohner in der westlichen Welt zwar ein selteneres Karzinom dar, allerdings ist innerhalb der letzten Jahre eine sehr deutlich steigende Tendenz an Neuerkrankungen zu verzeichnen. Um die Fragestellung nach einer Funktion von PAR₂ im Cholangiokarzinom zu bearbeiten, wurden im Rahmen der

1. Zusammenfassung

vorliegenden Arbeit Untersuchungen an Zellen einer Tumorzell-Primärkultur (CCC-787), die aus dem Tumorgewebe eines Patienten mit einem Cholangiokarzinom etabliert worden war, durchgeführt. Zunächst konnte mit Hilfe von RT-PCR nachgewiesen werden, dass PAR₂ in Zellen der Primärkultur CCC-787 exprimiert wird und somit diese Zellen für die weiteren Untersuchungen zur Funktion von PAR₂ auf zellulärer und Signalweiterleitungsebene geeignet waren. Unter Verwendung eines Assays, bei dem die Wanderung von Zellen durch eine kollagenbeschichtete Membranbarriere untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass PAR₂ in CCC-Zellen einen migratorischen Effekt vermittelt. Dies wurde geschlussfolgert, da (I) sowohl die Serinproteinase Trypsin als auch der PAR₂-selektive Peptidagonist 2-furoyl-LIGRLO-NH₂ eine signifikante Steigerung der Migration von CCC-787-Zellen induzierten, (II) der PAR₂-selektive Antagonist P2Pal-18S den migratorischen Effekt von Trypsin und von 2-furoyl-LIGRLO-NH₂ hemmte und (III) das PAR₂-inaktive Kontrollpeptid 2-furoyl-OLRGIL-NH₂ keinen Einfluss auf die Migration von Zellen der Primärkultur CCC-787 hatte.

Den wesentlichen Schwerpunkt der Arbeiten bildete die Klärung der Frage, ob in CCC-Zellen eine Wechselwirkung von PAR₂ mit der Rezeptortyrosinkinase Met vorkommt und diese in das migratorische PAR₂-Signaling involviert ist. Dazu wurden einmal Migrationsuntersuchungen mit den selektiven Met-Inhibitoren SU 11274 und PHA 665752 durchgeführt. Es ergab sich, dass diese Inhibitoren in der Lage waren, den Effekt von Trypsin bzw. 2-furoyl-LIGRLO-NH₂ auf die Migration von CCC-787-Zellen zu hemmen. Damit konnten erste Belege für eine Beteiligung von Met am migratorischen Signaling von PAR₂ erarbeitet werden. Zur weiteren Charakterisierung der PAR₂-Met-Interaktion wurde der Effekt einer PAR₂-Stimulation mit Trypsin bzw. dem PAR₂-Agonistpeptid 2-furoyl-LIGRLO-NH₂ auf die Phosphorylierungsaktivierung von Met in CCC-787-Zellen untersucht. In diesen, mit Hilfe von Western Blotting unter Verwendung eines Anti-pMet Antikörpers durchgeführten Experimenten, ergab sich, dass PAR₂ eine Met-Aktivierung vermittelte. Somit gelang es im Rahmen der vorliegenden Arbeit einen PAR₂-initiierten Signalweiterleitungsweg, der den HGF-Rezeptor Met einschließt, zu charakterisieren. Diese Signaling-Route besitzt eine regulatorische Funktion bei der Migration von Cholangiokarzinomzellen.

1. Zusammenfassung

Da die Migration von Tumorzellen ein wesentliches Charakteristikum des metastatischen Phänotyps eines Tumors darstellt, lässt sich auf eine Bedeutung der PAR₂-vermittelten Signalweiterleitung bei der Progression des CCCs schließen. Zudem kann perspektivisch vermutet werden, dass eine kombinierte Hemmung der PAR₂-Met-Signalachse die Grundlage für die Entwicklung eines neuen Ansatzes für die Therapie dieser Tumorart bilden kann.

2. Einleitung

2.1 Das Cholangiokarzinom

Epidemiologie

In Deutschland starben im Jahr 2010 218.889 Menschen an einer bösartigen Neubildung (Statistisches Bundesamt 2012). Damit belegt diese Gruppe den zweiten Rang unter den häufigsten Todesursachen nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (Robert Koch-Institut 2010). Nach dem hepatozellulären Karzinom (HCC) ist das Cholangiokarzinom (CCC), das auch als cholangiozelluläres Karzinom bezeichnet wird und zu dem alle Tumoren gerechnet werden, die vom Gallengangs- oder Gallenblasenepithel ausgehen (Tamandl et al. 2009), der zweithäufigste Tumor der Leber. Der Gesamtanteil des CCCs beträgt, gemessen an allen gastrointestinalen Tumoren, ca. 3 % (Tamandl et al. 2009).

Ätiologie

Die höchste Inzidenz des Cholangiokarzinoms findet sich in Südostasien, vor allem in Hongkong und Thailand. Hier besteht ein Zusammenhang zum Befall der Leber durch Trematoden, wie *Clonorchis sinensis* (Belamaric 2006). In westlichen Ländern ist das Cholangiokarzinom mit 1–3 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner pro Jahr seltener, zeigt jedoch auch hier eine deutlich steigende Inzidenz. Eine signifikante Häufung findet sich bei Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis oder Typ B und C Hepatitiden (Singh und Patel 2006). Weitere Risikofaktoren sind das Vorliegen einer Malformation der Gallenwege, wie beispielsweise Choledochuszysten oder das autosomal-rezessiv vererbte Caroli-Syndrom (Tamandl et al. 2009). Eine Häufung des CCCs wurde bei Patienten mit chronisch inflammatorischen Prozessen im Bereich der Gallenwege beobachtet (z. B. rezidivierende Cholangitiden) sowie bei Patienten mit einer Leberzirrhose oder der Exposition mit verschiedenen Toxinen, wie beispielsweise Dioxinen oder dem bereits seit Mitte der 1950er Jahre verbotenen Röntgenkontrastmittel Thorotrast - hier konnte aber letztlich kein definitiver Risikofaktor abgeleitet werden (Tamandl et al. 2009).

2. Einleitung

Makropathologie und Tumorausbreitung

Cholangiokarzinome zeigen sich zumeist als solitäre, grau-weiße Herde, teilweise erkennt man Satelliten (Weinbren und Mutum 1983). Schon makroskopisch kann der hohe Bindegewebsgehalt des Tumors an zum Teil zentralen Narbenbildungen erkannt werden (Liguory und Canard 1983). Das umgebende Lebergewebe zeigt lediglich in 20 % eine Zirrhose (Kaczynski et al. 1996), obwohl eine umschriebene hepatische Fibrose oder zystische Erweiterungen der Gallengänge in der Nachbarschaft des Tumors vorkommen können (Okuda et al. 1977). Sind CCCs in Lebern mit sklerosierender Cholangitis hilusnah entstanden, kann die makroskopische Differenzierung zwischen Fibrose und Tumor schwierig sein, so dass ausgedehnt histologisch untersucht werden sollte (Liguory und Canard 1983). Eine durch langdauernde, obstruktionsbedingte Cholestase entstandene Cholangitis mit konsekutiver Fibrose des Lebergewebes ist möglich (Moto und Kawarada 1987). Im Gegensatz zum hepatozellulären Karzinom zeigen CCCs in geringerem Ausmaß eine Infiltration größerer (portalvenöser) Gefäße, allerdings findet man bei ihnen häufiger Lymphknotenmetastasen und eine hämatogene Metastasierung sowie Peritonealmetastasen (Okuda et al. 1977, Kawarada und Mizumoto 1984). Unter chirurgischem Aspekt wird das CCC in intra- und extrahepatische CCCs unterteilt. Bei dieser Unterteilung nimmt das Karzinom der Gallenblase eine Sonderstellung bezüglich der Therapie als auch der Prognose ein. Die intrahepatischen Cholangiokarzinome (ca. 10 %) gehen von den Gallengängen peripher der zweiten Dichotomie aus. Sie imponieren häufig als solitäre oder multiple Lebertumore, deren differenzialdiagnostische Abgrenzung gegenüber Metastasen anderer gastrointestinaler Adenokarzinome oft schwierig ist. Extrahepatische CCCs lassen sich in perihiläre CCCs, Karzinome der Hepaticusgabel (entspricht einem Klatskin-Tumor) und distale CCCs in Höhe des Pankreaskopfes einteilen (Tamandl et al. 2009).

Mikroskopie

Cholangiokarzinome sind Adenokarzinome. Sie zeigen eine drüsige Differenzierung, die aus kleinen, kuboidalen epithelialen Zellformationen bestehen, an Gallenwegsepithelien erinnern und Mucin sezernieren (Nakajima et al. 1988).

2. Einleitung

Daneben sind auch solide Abschnitte möglich, die keine glanduläre Differenzierung aufweisen. Außerdem können diffuse, in bindegewebiges Stroma eingebettete einzelne Tumorzellkomplexe vorkommen. Im Kindesalter kommen Cholangiokarzinome auch als embryonale Rhabdomyosarkome vor (Raney et al. 1978).

Stadieneinteilung und Differenzierung

Das Staging des Tumors, also die Beurteilung der Größe und Anzahl der Tumoren, Befall der Gallengänge, Infiltration ins Gewebe, Lymphknoten- und Fernmetastasen wird mit Hilfe einer eigenen TNM-Klassifikation durchgeführt. Entsprechend der TNM-Klassifikation lässt sich auch das UICC-Stadium bestimmen (Sobin und Wittekind 2009).

Klinik und Prognose

Klinisch treten keine Frühsymptome auf, das Auftreten von Symptomen entspricht einem Spätbefund und damit einem fortgeschrittenen Tumorwachstum. Das Leitsymptom des CCCs ist der schmerzlose Ikterus. Klinisch kann das Courvoisier'sche Zeichen (Kombination aus schmerzlosem Ikterus und tastbar vergrößerter Gallenblase) für ein CCC sprechen. Weitere Hinweise sind Pruritus und (Tumor-)Kachexie. Prädispositionsstellen sind die Zusammenflüsse der beiden Ductus hepatices (Klatskin-Tumor) sowie vom Ductus cysticus mit dem Ductus hepaticus communis (Welzel et al. 2006). Trotz seines langsamen Wachstums und der späten Metastasierung hat das Cholangiokarzinom eine schlechte Prognose. Absiedelungen finden sowohl hämatogen als auch lymphogen statt (Nakajima et al. 2002).

Diagnostik und Therapie

Bisher sind keine spezifischen Tumormarker für das Cholangiokarzinom bekannt, jedoch konnte in einer Studie mit insgesamt 692 Patienten, die an primär sklerosierender Cholangitis erkrankten und von denen 44 ein CCC aufwiesen, der diagnostische Nutzen des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) nachgewiesen werden. Das positive Testergebnis (cut-off) wurde ab 5,2 µg/l CEA-Serumkonzentration determiniert. Hierbei konnte eine Sensitivität von 68 % und eine

2. Einleitung

Spezifität von 82 % für das Vorliegen eines CCCs gezeigt werden. 18 % der Befunde waren falsch-positiv (Siqueira et al. 2002). Zwar gibt es auch Hinweise für eine mögliche Verwendung des Carbohydrate-Antigens 19-9 (CA 19-9) im Rahmen der CCC-Diagnostik, allerdings sind die bisherigen Daten nicht valide genug, um eine Aussage zur Eignung von CA 19-9 als Marker treffen zu können (Patel et al. 2000, Siqueira et al. 2002).

Aufgrund der Heterogenität der diagnostischen Möglichkeiten soll hier nur eine Auswahl der wichtigsten und verbreitetsten Untersuchungsmethoden erfolgen.

ERC/ERCP. Die endoskopische retrograde Cholangio-Pankreatikographie ermöglicht die retrograde Kontrastierung der Gallenwege und kann bei am CCC erkrankten Patienten die typische Morphologie am zuverlässigsten nachweisen. Bei dieser Untersuchung kann durch Bestimmung der Tumorausdehnung häufig auch die Frage nach einer chirurgischen Intervention (Resektion) geklärt werden. In einer Studie mit 98 Patienten, die aufgrund der ERC mit der Diagnose eines Klatskin-Tumors reseziert wurden, konnte diese Diagnose bei 69 % intraoperativ gesichert werden. Bei 31 % der Patienten wurden andere Entitäten identifiziert (Wetter et al. 1991).

Sonografie. Abdomensonografisch bietet das CCC ein heterogenes Bild (Bloom et al. 1999). So konnte in einer Studie mit 39, am Klatskin-Tumor erkrankten Patienten bei 87 % die Neoplasie sonografisch nachgewiesen werden. Die Tumormasse war bei 65 % der Patienten isodens zum umgebenden Leberparenchym, bei 21 % hyperdens und bei 15 % hypodens (Hann et al. 1997).

CT. Hinweise auf CCCs bieten intrahepatische Gallengangsdilatationen bei pathologischen Raumforderungen im Bereich der Gallengänge. Für eine portalvenöse Tumordinvasion spricht zusätzlich das Vorliegen eines atrophierten Leberlappens bei gleichzeitiger kompensierender Hypertrophie des anderen Leberlappens (Hann et al. 1996). In 34 % der Fälle ist diese Tumorentität schon in nativen Aufnahmen sichtbar (Tillich et al. 1998), während Kontrastmitteluntersuchungen sehr sensitiv für die Diagnosestellung sind (Valls et al. 2000).

MRT. Als nichtinvasive Magnetresonanztomographie (MRCP) ermöglicht dieses Verfahren eine dreidimensionale Gallengangsdarstellung. Direkte vergleichende Studien von ERC (ohne Berücksichtigung von Zytologie oder Histologie) mit der Magnetresonanztomographie (MRC) zeigen beim Vorliegen

2. Einleitung

einer Gallengangsobstruktion für beide Methoden eine ähnlich gute Aussagekraft (Courbiere et al. 2003). Dies gilt insbesondere zur Beurteilung der Notwendigkeit einer palliativen Endoprotheseneinlage bei Nichtresektabilität (Hintze et al. 2001). Eine Studie mit 40 Patienten, die die Symptome eines schmerzlosen Ikterus' und einer Gallengangsstenose zeigten, belegte mit 85 % die gleiche Sensitivität für das Vorliegen eines Malignoms wie die ERCP. Die Spezifität lag mit 71 % knapp unter der der ERCP (Rösch et al. 2002).

Im Gegensatz zu den Fortschritten bei der Diagnostik sind die therapeutischen Möglichkeiten beim Cholangiokarzinom unzureichend. Gegenwärtig umfasst das chirurgische Management des CCCs als einzige kurative Therapie die frühzeitige Operation. Bei intrahepatischen CCCs ist die Leberresektion die Therapie der Wahl. Trotz des Ziels der Heilung liegt die mittlere Überlebensrate bei dieser Therapie bei 41,9 Monaten und die 5-Jahres-Überlebensrate lediglich bei 25,5 % (Vauthey et al. 2004). Perihiläre CCCs (Klatskin-Tumore) werden nach der Bismuth-Corlette-Klassifikation unterschiedlich behandelt. Klatskin-Tumore des Stadiums I (hilusnah, erreicht nicht die Hepatikusgabel) und des Stadiums II (hilusnah, erreicht die Hepatikusgabel) werden en bloc reseziert. In Stadium III (hilusnah, infiltriert Ductus hepaticus dexter oder sinister) erfolgt zusätzlich zur Resektion der extrahepatischen Gallenwege eine Leberteilresektion, um die sonst hohe Rezidivrate zu vermeiden. Dennoch beträgt auch hier die 5-Jahres-Überlebensrate nur 25,8 % (Nagino et al. 1998, Harder et al. 2009). Generell ist festzuhalten, dass bei Stadium III und IV (hilusnah, infiltriert Ductus hepaticus dexter und sinister) eine größere chirurgische Intervention zum Erreichen einer R0-Situation notwendig ist. Es wird z. B. die Resektion der V. portae empfohlen (Harder et al. 2009). Bereits bei Vorliegen des Stadiums II wird wegen der bekannten frühen Infiltration des CCCs eine Entfernung des Lobus caudatus empfohlen (Nakeeb et al. 1996). Beim distalen CCC ist die Therapie der Wahl die Pankreatikoduodenektomie nach Whipple. Hierbei beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 30,1 % (Jang et al. 2005).

Unter dem Ziel der Palliation stehen weitere Therapieoptionen zur Verfügung. Mit der Etablierung von 5-Fluorouracil konnte im Vergleich zur Best-Supportive-Care-Strategie eine Verlängerung der Überlebenszeit von 2,5 auf 6 Monate auch unter Verbesserung der Lebensqualität erreicht werden (Nehls et al. 2008). Inzwischen

2. Einleitung

stehen wirkungsvollere chemotherapeutische Konzepte zur Auswahl. Zum Beispiel konnte die mediane Überlebenszeit bei einer Chemotherapie mit Gemcitabin und Oxaliplatin, einer für das CCC aktuell sehr anerkannten Therapie, auf 11 Monate angehoben werden (Thongprasert 2005, Harder et al. 2006). Intra- und extrahepatische CCCs sprechen unterschiedlich auf die gleiche Chemotherapie an (Nehls et al. 2008). Die Suche nach noch wirkungsvolleren Regimes hält an.

Als weiteres palliatives Verfahren steht seit einigen Jahren zusätzlich die Photodynamische Therapie zur Verfügung, bei welcher der Tumor endoluminal mit Licht in Kombination mit einem systemisch eingebrachten Photosensibilisator bestrahlt wird. Aufgrund der entstehenden Sauerstoffradikale führt dies zur Nekrotisierung von Tumorzellen (Harder et al. 2009). Die mittlere Überlebenszeit lag hier bei 276 Tagen, gerechnet ab dem ersten Behandlungstag (Harewood et al. 2005).

Einer neuen Studie zufolge bietet die stereotaktische Radiofrequenzablation von intrahepatischen CCCs mediane Überlebenszeiten von 60 Monaten bei nicht resektablen CCCs. Damit könnte sich hier in der Zukunft eine weitere Alternative bei der Behandlung des CCCs bieten (Bale et al. 2013).

Insgesamt ergibt sich somit, dass dringend neue, vor allem auch systemische Ansätze nötig sind. Dabei hat sich die Aufklärung molekularer Mechanismen der Cholangiokarzinogenese als eine wichtige Grundlage für die Erarbeitung neuer therapeutischer Strategien erwiesen (Sia et al. 2013). In jüngsten Studien mit Inhibitoren verschiedener intrazellulärer Signalweiterleitungswege, insbesondere der Ras-Raf-MEK-ERK- und VEGF-Rezeptor-Achse, konnten mit dem Multikinasehemmer Sorafenib erste Erfolge bei der Behandlung des nichtresektablen CCCs erzielt werden, so dass diese Richtung intensiv weiter betrieben wird (El-Khoueiry et al. 2012).

2.2 Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PARs)

Die Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PARs) sind eine Gruppe der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die aus vier Subtypen (PAR₁–PAR₄) besteht und zelluläre Effekte verschiedener Proteinasen, insbesondere Serinproteinasen, vermittelt (Hollenberg und Compton 2002, Ossovskaja und

2. Einleitung

Bunnnett 2004, Steinhoff et al. 2005, Ramachandran et al. 2012). PAR₁ (Vu et al. 1991a und b, Rasmussen et al. 1991), PAR₃ (Ishihara et al. 1997) und PAR₄ (Xu et al. 1998, Kahn et al. 1998a) können in erster Linie durch Thrombin aktiviert werden. PAR₂ (Nystedt et al. 1994) ist ein Rezeptor für Trypsin, Mastzell-Tryptase, Matriptase1, den Komplex Tissue Factor/Gerinnungsfaktor VIIa/Gerinnungsfaktor Xa sowie Kallikreine und Parasiten-Cystein-Proteinasen; er ist kein Rezeptor für Thrombin (Steinhoff et al. 2005, Ramachandran und Hollenberg 2007, Grab et al. 2009).

2.2.1 Der Proteinase-aktivierte Rezeptor 2

2.2.1.1 Struktur

Die genetische Information für PAR₂ ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 5 (Region q13) gespeichert. Das Gen beinhaltet zwei Exons, die durch ein Intron (14 kb) unterbrochen werden. Das 2. Exon kodiert die Information für die Spaltstelle im N-terminalen Bereich des Rezeptors (SKGR³⁶/S³⁷LIGKV) (Nystedt et al. 1994, 1995, Böhm et al. 1996, Kahn et al. 1998b, Schmidt et al. 1997). Die Proteinsequenz umfasst 397 Aminosäuren.

2.2.1.2 Aktivierungsmechanismus

PARs besitzen einen für GPCR ungewöhnlichen Aktivierungsmechanismus. Dieser ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt und umfasst zunächst die enzymatische Spaltung des Rezeptors im Amino-Terminus, im Falle von PAR₂ z. B. durch die Serinproteinase Trypsin. Dadurch entsteht ein neuer N-Terminus, der nun erst als Rezeptorligand, als so genannter „tethered ligand“ („gebundener Ligand“), fungiert und durch Bindung an den 2. extrazellulären Loop den eigenen Rezeptor aktiviert.

Nachfolgend wird über eine Kopplung an regulatorische Membranproteine (G-Proteine, β -Arrestine) ein komplexes intrazelluläres Signalweiterleitungsnetzwerk initiiert (Hollenberg und Compton 2002, Ramachandran et al. 2012). Wie in Abbildung 1 ebenfalls ersichtlich, gibt es im Aktivierungsmechanismus der PARs eine weitere Besonderheit. Diese besteht in der Möglichkeit den jeweiligen Rezeptor-Subtyp mit synthetischen Peptiden, die in ihrer Sequenz den ersten 4–14 Aminosäuren des „tethered ligand“ entsprechen, selektiv zu aktivieren. In

2. Einleitung

Abbildung 1 ist diese Aktivierungsvariante für PAR₂ mit dem Hexapeptid SLIGRL-NH₂ dargestellt, das in seiner Sequenz den ersten sechs Aminosäuren der N-terminalen Sequenz des Maus-PAR₂ entspricht und das in der Lage ist, sowohl den murinen als auch den humanen PAR₂ zu aktivieren. Ganz wesentlich dabei ist, dass diese sog. PAR-aktivierenden Peptide (PAR-APs) eine Rezeptoraktivierung induzieren, ohne dass es einer Spaltung des Rezeptors bedarf.

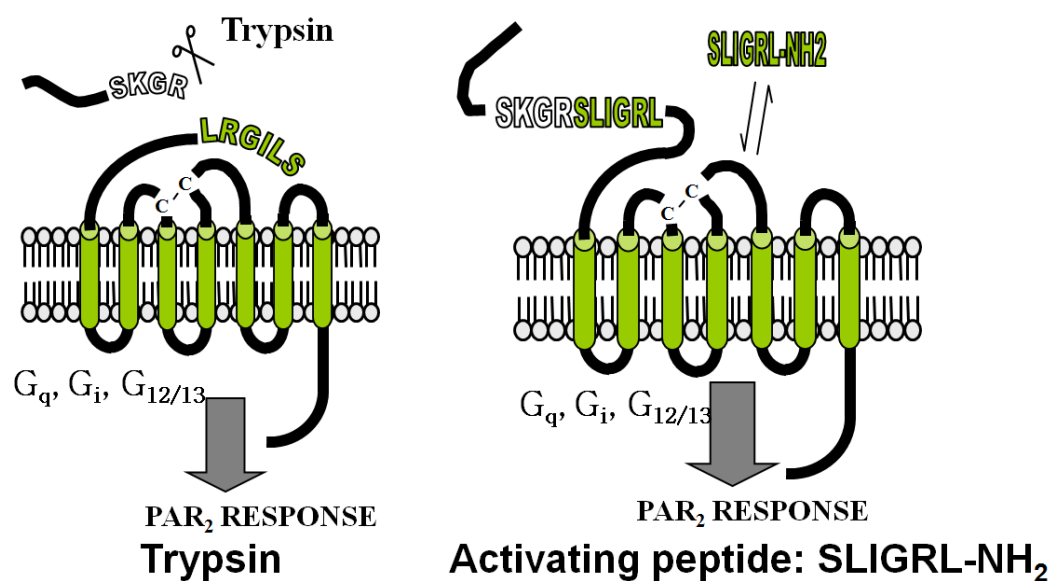


Abb. 1) Aktivierung von PAR₂ durch zwei verschiedene Mechanismen:

linke Seite: Durch die proteolytische Spaltung des Rezeptors an einer definierten Stelle im N-Terminus durch die Serinproteinase Trypsin entsteht ein neuer N-Terminus, der als „tethered ligand“ fungiert und durch Interaktion mit dem zweiten extrazellulären Loop des Rezeptors die Aktivierung bewirkt.

rechte Seite: Ein von der PAR₂-Neo-N-terminalen Sequenz abgeleitetes Peptid (PAR₂-AP), (SLIGRL-NH₂) interagiert mit dem zweiten extrazellulären Loop, ohne dass es einer proteolytischen Spaltung bedarf (modifiziert nach Hollenberg und Compton 2002).

2.2.1.3.1 G-Protein-Kopplung

Durch die Bindung des „tethered ligand“ an PAR₂ im zweiten extrazellulären Loop wird die Aktivierung dieses GPCRs initiiert. Dabei kommt es zu einer Bindung des Rezeptors an G-Proteine (Guanylnukleotid-bindende Proteine), welche die weitere Signaltransduktion steuern und bei deren Aktivierung ligandinduzierte

2. Einleitung

Konformationsänderungen der Helices 3 und 6 des jeweiligen Rezeptors wesentlich sind (Gether und Kobilka 1998). Die Kopplung an verschiedene G-Proteine erfolgt vor allem über den 3. intrazellulären Loop (ICL) (Cotecchia et al. 1992).

In diesem Kontext ist relevant, dass auf der Grundlage der Aminosäuresequenz des 3. ICLs ein potenter, selektiver PAR₂-Rezeptor-Antagonist entwickelt wurde, der auch im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit Verwendung fand. Hierbei handelt es sich um das palmitoylierte Peptid N-palmitoyl-RSSAMDENSEKKRKRAIK-NH₂-Rezeptor-Antagonist (P2pal-18S) (Sevigny et al. 2011).

2.2.1.3.2 Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten: α , β und γ . Die α -Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für GTP und GDP und verfügt über eine GTPase-Aktivität; die β - und γ -Untereinheit sind als Dimerkomplex aktiv. Im inaktiven G-Protein ist die α -Untereinheit mit GDP assoziiert und an den $\beta\gamma$ -Untereinheitenkomplex gebunden. PAR₂ erkennt dieses Heterotrimer und es kommt zur G-Proteinbindung. Im Folgenden dissoziiert GDP von der α -Untereinheit und GTP wird gebunden. Dies führt zu einer Konformationsänderung, so dass sich die α -Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Komplex und vom Rezeptor löst. Sowohl die α -Untereinheit, an die GTP gebunden bleibt, als auch der $\beta\gamma$ -Komplex sind nun in der Lage die Aktivierung verschiedener Effektorsysteme zu vermitteln. Die Rückführung des G-Proteins in die inaktive Ausgangskonformation wird durch Hydrolyse von GTP zu GDP durch die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit eingeleitet und nachfolgend kommt es zur Reassoziierung der α -Monomer/GDP- und der $\beta\gamma$ -Dimer-Untereinheit, so dass wieder das heterotrimere G-Protein vorliegt.

Die Einteilung der G-Proteine erfolgt anhand der Struktur der α -Untereinheiten. Auf diese Weise lassen sich vier Familien unterscheiden: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$ (Offermanns et al. 1994, Morris und Malbon 1999). Neben 16 α -Untereinheiten lassen sich 5 β - und 14 γ -Untereinheiten finden (Milligan und Kostenis 2006). $G\alpha_s$ aktiviert die Adenylatzyklase (AC), $G\alpha_{i/o}$ inhibiert die AC, $G\alpha_{q/11}$ aktiviert die Phospholipase C (PLC), $G\alpha_{12}$ stimuliert die Phospholipase D und die Proteinkinase C (PKC) und $G\alpha_{13}$ wirkt über die Phosphatidylinositol-3-Kinase. Der $G\beta/\gamma$ -Komplex

2. Einleitung

vermittelt ein Signaling u. a. über die PLC und über Ionenkanäle (Clapham und Neer 1993, 1997, Neves et al. 2002).

2.2.1.4 Signaltransduktion

Die PAR₂-Aktivierung führt einerseits zur klassischen G-Protein-gekoppelten Signalübertragung, andererseits sind G-Protein-unabhängige Wege beschrieben, die über eine Assoziation mit β -Arrestinen realisiert werden (Schaffner und Ruf 2009, Ramachandran et al. 2012). In Abbildung 2 sind Vorstellungen über G-Protein-abhängige und -unabhängige Effekte von PAR₂ in der Tumormikroumgebung schematisch stark vereinfacht dargestellt.

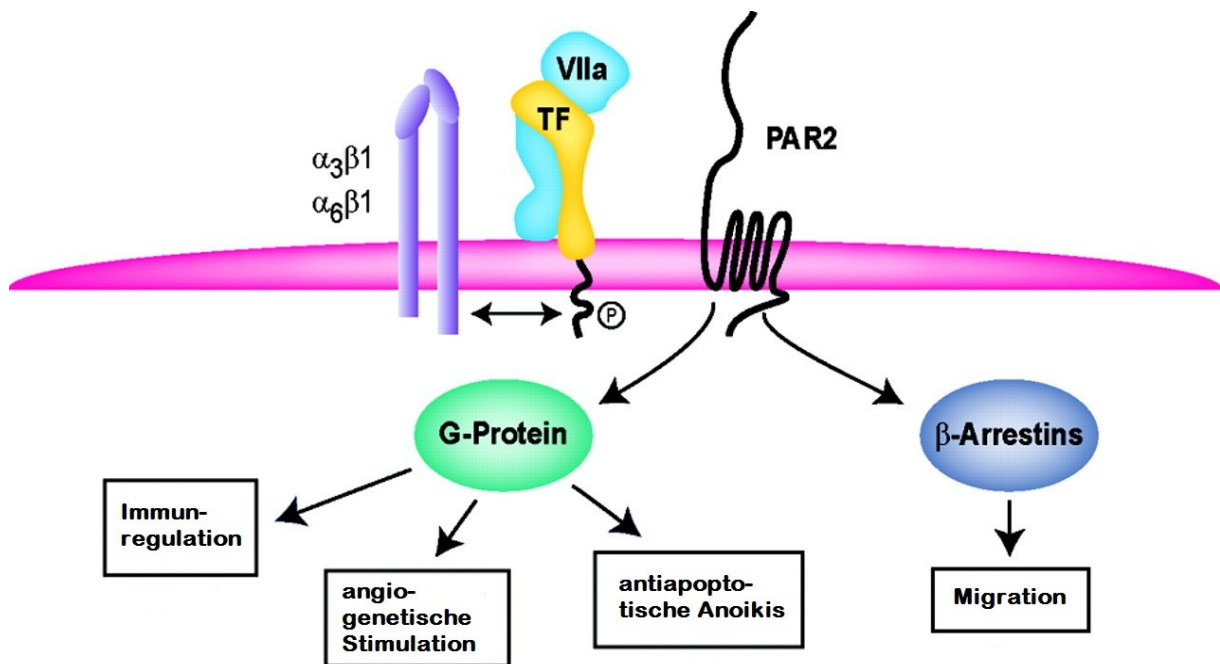


Abb. 2) G-Protein- und β -Arrestin-abhängiges Singaling des Systems TF-VIIa-PAR₂ in Zellen der Tumormikroumgebung

Der TF/VIIa-Komplex, der PAR₂ aktiviert, interagiert zudem mit β 1-Integrinen, die zur Regulation des TF-VIIa-PAR₂-Signaling beitragen. PAR₂ vermittelt immunregulatorische, angiogene sowie antiapoptotische Effekte über eine G-Proteinkopplung. Über eine Rekrutierung von β -Arrestin wird ein migratorisches Signaling induziert (modifiziert nach Schaffner und Ruf 2009).

Für die intrazelluläre Signalweiterleitung von PARs ist von wesentlicher Bedeutung, dass verschiedene Rezeptor-Agonisten in der Lage sind, unterschiedliche

2. Einleitung

Konformationsänderungen, die jeweils unterschiedliche intrazelluläre Effekte auslösen können, am Rezeptor zu verursachen. Dieses Phänomen wurde bereits in den 1970er Jahren mit dem „receptor floating model“ charakterisiert (de Haën 1976, Jacobs und Cuatrecasas 1976) und in jüngster Zeit zum Konzept der „funktionellen Selektivität“ bzw. des sog. „biased agonism“ weiterentwickelt (Kenakin und Miller 2010). Auch für die PAR₂ gibt es erste Belege für ein derartiges Verhalten im Signaling (Ramachandran et al. 2009). Neben dem G-Protein- sowie Arrestin-getriebenen Signaling, durch das zentrale intrazelluläre Effektorsysteme, u. a. MAP-Kinasen und PI3K, reguliert werden können (Ge et al. 2004, Zouldilova et al. 2007, DeFea 2008, Ramachandran et al. 2009, Wang et al. 2010), kann PAR₂ ein Signalweiterleitungsprinzip nutzen, das als GPCR-vermittelte Rezeptortyrosinkinase-Transaktivierung bezeichnet wird (Daub et al. 1996) und das in Bezug auf das Konzept der vorliegenden Arbeit besonders wichtig ist. Bei dieser Rezeptorinteraktion kommt es nach Stimulation eines GPCRs zur Aktivierung einer RTK, wobei verschiedene Ligand-abhängige und -unabhängige Mechanismen wirken können (Wetzker und Böhmer 2003). Dieser Rezeptor-Interaktionstyp wird inzwischen als ein fundamentales Prinzip in der intrazellulären Signalweiterleitung angesehen und auch für PAR₂ konnte ein derartiger Mechanismus für den EGFR in Zellen verschiedener Karzinome (Darmoul et al. 2004a, Kawao et al. 2005, Caruso et al. 2006, Li et al. 2006, Jarry et al. 2007, van der Merwe et al. 2008) sowie für den PDGF-Rezeptor an Monozyten, Fibroblasten und Aorta-Endothelzellen (Siegbahn et al. 2008) gezeigt werden. Schließlich gelang es der eigenen Arbeitsgruppe zu zeigen, dass PAR₂ auch in der Lage ist, die Transaktivierung einer weiteren RTK, und zwar des HGF-Rezeptors Met, zu vermitteln, wobei dieser Rezeptor-Crosstalk in das migratorische Signaling von HCC-Zellen involviert ist (Kaufmann et al. 2009).

2.2.1.5 Inaktivierung

An der Inaktivierung von PAR₂ sind eine ganze Reihe verschiedener Mechanismen beteiligt (Review z. B.: Ramachandran et al. 2012). Dabei sind Komplexbildungen mit β -Arrestinen, die über Phosphorylierungen im C-Terminus des Rezeptors initiiert werden (Böhm et al. 1996, Seatter et al. 2004, Ricks und Trejo 2009), sowohl für die Desensitivierung des Signaling als auch für die Rezeptor-Internalisierung und den

2. Einleitung

Transport zu frühen und späten Endosomen sowie Lysosomen, in denen schließlich der Rezeptorabbau erfolgt (Dery et al. 1999, Roosterman et al. 2003), von entscheidender Bedeutung. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Deubiquitinierung von PAR₂ und dessen Wechselwirkung mit einem speziellen HGF-regulierten Tyrosinkinasesubstrat (lysosomal sorting protein hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) in diese Transportprozesse involviert sind (Hasdemir et al. 2007, 2009). Neben diesen Inaktivierungsvorgängen mit lysosomaler Rezeptordegradation gibt es auch Hinweise für eine permanente Migration von PAR-Molekülen zwischen der Zelloberfläche und intrazellulären Speichern. Offensichtlich sind die Zellen dadurch in der Lage PARs nach Spaltung und Internalisierung aus diesen Reservepools wieder an die Zelloberfläche zu transportieren. So ist eine Zelle sehr rasch in der Lage, PARs für Ligand-Interaktionen bereitzustellen, ohne dass dafür eine Rezeptor-Neusynthese erfolgen muss (Hein et al. 1994, Déry et al. 1998, Shapiro et al. 1998, Macfarlane et al. 2001, Hollenberg und Compton 2002).

2.2.1.6 Funktionen

PAR₂ konnte in verschiedensten Organsystemen nachgewiesen werden, wie z. B. im Gastrointestinaltrakt, Zentralnervensystem, peripheren Nervensystem, Bronchialsystem, Urogenitalsystem, dem Immunsystem sowie der Haut. Es konnte gezeigt werden, dass PAR₂ eine Bedeutung bei neurogenen Prozessen, Algesie und Hyperalgesie hat (Cottrell et al. 2003). Weiterhin besitzt dieser Membranrezeptor gefäßregulatorische Eigenschaften (Cheung et al. 1998, Roy et al. 1998, Cicala et al. 2001, Robin et al. 2003) und spielt im kardiovaskulären System bei Mechanismen der Vasodilatation, Extravasation von Plasmaproteinen und der Proliferation von Endothelzellen eine Rolle (Steinhoff et al. 2005). Im Pulmonalsystem wurde PAR₂ an der glatten Muskulatur, Endothelzellen und Fibroblasten nachgewiesen, wo er Bronchodilatation und -konstriktion sowie eine vermehrte Prostaglandin₂-Freisetzung und pro- und antiinflammatorische Wirkungen vermittelt (Chow et al. 2000, Cocks und Moffatt 2000, Ricciardolo et al. 2000, Lan et al. 2001, Schmidlin et al. 2002, Steinhoff et al. 2005). Weitere Wirkungen von PAR₂ betreffen eine Steigerung der Mobilität von Leukozyten sowie deren Adhäsions-, Rolling- und Migrationsfähigkeit (Vergnolle 1999, Lindner et al. 2000). Da humanpathogene Bakterien

2. Einleitung

Serinproteinasen mit trypsinähnlicher Aktivität bilden, kann PAR₂ bei einer bakteriell verursachten Entzündungsreaktion eine Immunantwort vermitteln. Vermutlich wird PAR₂ als Rezeptor für die körperfremden Serinproteinasen genutzt (Lourbakos et al. 2001, Moffatt et al. 2002, Steinhoff et al. 2005). Bei Entzündungen der Haut wird ebenfalls eine Beteiligung von PAR₂ vermutet; eine Expression von PAR₂ ist hier für Keratinozyten und dermale Endothelzellen belegt. Diese Zellen sind Targets von inflammatorischen Mediatoren (Santulli et al. 1995, Derian et al. 1997, D'Andrea et al. 1998). Auch Mastzell-Tryptase, die nahezu ausschließlich von Mastzellen exprimiert wird und eine wichtige Rolle bei allergischen und entzündlichen Reaktionen der Haut spielt, kann PAR₂ aktivieren. In entzündlich veränderter Haut wird PAR₂ in sensorischen Nervenfasern verstärkt exprimiert. Es wird vermutet, dass Mastzellen auf diese Weise mit Neuronen kommunizieren. Steinhoff und Mitarbeiter zeigten, dass eine PAR₂-Aktivierung über eine Neuropeptidfreisetzung zur neurogenen Entzündung führt (Steinhoff et al. 2000). Im ZNS konnte eine Beteiligung von PAR₂ bei de- und regenerativen Prozessen belegt werden. So wurde bei PAR₂-defizienten Mäusen nach einer induzierten Apoplexia cerebri mittels arterieller Okklusion eine gesteigerte Hirnschädigung in den ischämischen Arealen gefunden (Luo et al. 2007). Im Gastrointestinalum zeigte sich eine PAR₂-Beteiligung bei der Regulation von Ionenkanalaktivitäten im Enterozyt, weiterhin war PAR₂ an der Bildung von Prostaglandinen in Myozyten der Muscularis mucosae beteiligt. Ebenso exprimieren Azinuszellen und duktaile Zellen des Pankreas' PAR₂. Anschließend wurde eine vermehrte Pankreassaftproduktion beobachtet (Kong et al. 1997, Green et al. 2000).

2.2.1.7 PAR₂ und Karzinogenese

Während der vergangenen Jahre konnte PAR₂ in verschiedenen Tumorarten nachgewiesen werden (Bohm et al. 1996, D'Andrea et al. 2001, Darmoul et al. 2001), wobei vor allem für Karzinome umfangreiche Untersuchungen durchgeführt wurden und diese für eine Funktion bei Wachstum und Metastasierung sprechen (Jikuhara et al. 2003, Darmoul et al. 2003 und 2004b, Ge et al. 2004, Hjortoe et al. 2004, Shi et al. 2004, Shimamoto et al. 2004, Rattenholl et al. 2007, Bergmann et al. 2006, Kaufmann et al. 2007). Dabei betreffen die bisherigen Arbeiten auf diesem Gebiet im

2. Einleitung

Wesentlichen die Tumorzellen selbst. Allerdings konnte beispielsweise im Falle des Mammakarzinoms PAR₂ nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in anderen Zellarten der Tumormikroumgebung wie Makrophagen, Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden (D'Andrea et al. 2001). Zudem wurde für das Mammakarzinom gezeigt, dass PAR₂ migratorische Effekte der Gerinnungsfaktoren VIIa und Xa vermittelt (Morris et al. 2006). Beim Kolonkarzinom konnte eine proliferative Wirkung belegt werden, die durch PAR₂ getriggert wird, wobei offensichtlich die Serinproteinase Trypsin als PAR₂-Aktivator fungiert. Das mitogene Signaling wird über eine EGF-Rezeptor-Transaktivierung gesteuert, wobei die Beteiligung von p42/p44-MAP-Kinasen nachgewiesen werden konnte (Jikuhara et al. 2003, Darmoul et al. 2004b). Ebenso wird für PAR₂ ein proliferationsfördernder Effekt auf das Wachstum und die Metastasierung des Pankreaskarzinoms vermutet (Kaufmann et al. 1998, Ikeda et al. 2003). Auch beim malignen Melanom und beim Prostatakarzinom wurde ein PAR₂-vermittelter Effekt auf die Zellmigration und -invasion nachgewiesen (Shi et al. 2004). Aus Untersuchungen an HaCaT-Keratinocyten wurde geschlussfolgert, dass PAR₂ auch eine tumorsuppressive Rolle spielen kann.

Insgesamt haben die bisherigen Untersuchungen zur Funktion von PAR₂ in Tumoren gezeigt, dass man nicht von einer einheitlichen Wirkung ausgehen kann, sondern dass diese offensichtlich maßgeblich durch den jeweiligen spezifischen zellulären Kontext beeinflusst wird. Deshalb ist es auch notwendig die Funktion von PAR₂ spezifisch für jede Tumorentität zu bestimmen.

2.3 Die Rezeptortyrosinkinase Met

Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) sind Rezeptoren, deren intrazelluläre Domäne eine Tyrosinkinaseaktivität besitzt und die damit die Phosphorylierung von Tyrosinresten ermöglicht. Die RTK Met ist Rezeptor für den hepatocyte growth factor (HGF), den man auch als scatter factor (SF) bezeichnet (Stoker et al. 1987, Nakamura et al. 1989, Naldini et al. 1991a, Weidner et al. 1996). Met wird auf Epithelien von Leber, Magen, Ösophagus, Ovarien, Endometrien exprimiert, aber auch von Melanozyten, Endothelien, Neuronen und Gliazellen (Prat et al. 1991, Zarnegar und Michalopoulos 1995) und spielt u. a. eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Regeneration der

2. Einleitung

Leber. Aber auch bei der Entstehung und Progression von verschiedensten Tumoren hat diese Rezeptortyrosinkinase wesentliche Funktionen (Comoglio und Trusolino 2002, Birchmeier et al. 2003, Huh et al. 2004, Gentile et al. 2008, Trusolino et al. 2010). Auch eine Met-Überexpression konnte für verschiedene Karzinome, so das CCC, gezeigt werden (Terada et al. 1998).

2.3.1 Struktur

Das Met-Protoonkogen ist auf dem Chromosom 7g12-37 lokalisiert. Das Met-Protein umfasst 1390 Aminosäuren und wird als 170 kD Vorläuferprotein im Post-Golgi-Kompartiment synthetisiert. Durch dessen proteolytische Prozessierung entsteht ein Heterodimer, das aus einer α -Kette (50 kD) und einer β -Kette (145 kD) besteht. Wie in Abbildung 3 (s. nächste Seite) schematisch dargestellt, sind beide Monomereinheiten über Disulfidbrücken verbunden. Der extrazelluläre Teil des Met-Proteinmoleküls besteht aus drei Domänen, der N-terminalen, aus 500 Aminosäuren bestehenden Semaphorin-Domäne (Sema), die die gesamte α -Kette und einen Teil der β -Kette umfasst, gefolgt von der 50 AS-umfassenden Plexin-Semaphorin-Integrin-Domäne (PSI) mit vier Disulfidbrücken. PSI ist mit der transmembranalen Helix über vier Immunglobuline-Plexin-Transcriptionsfaktor-Domänen (IPT) verbunden. Im intrazellulären Bereich besteht das Met-Proteinmolekül aus einer katalytischen Tyrosinkinase-Domäne, die mit einer juxtamembranen Domäne sowie verschiedenen COOH-terminalen Sequenzen assoziiert ist (Naldini et al. 1991a und b, Duh et al. 1997, Trusolino und Comoglio 2002, Birchmeier et al. 2003).

2. Einleitung

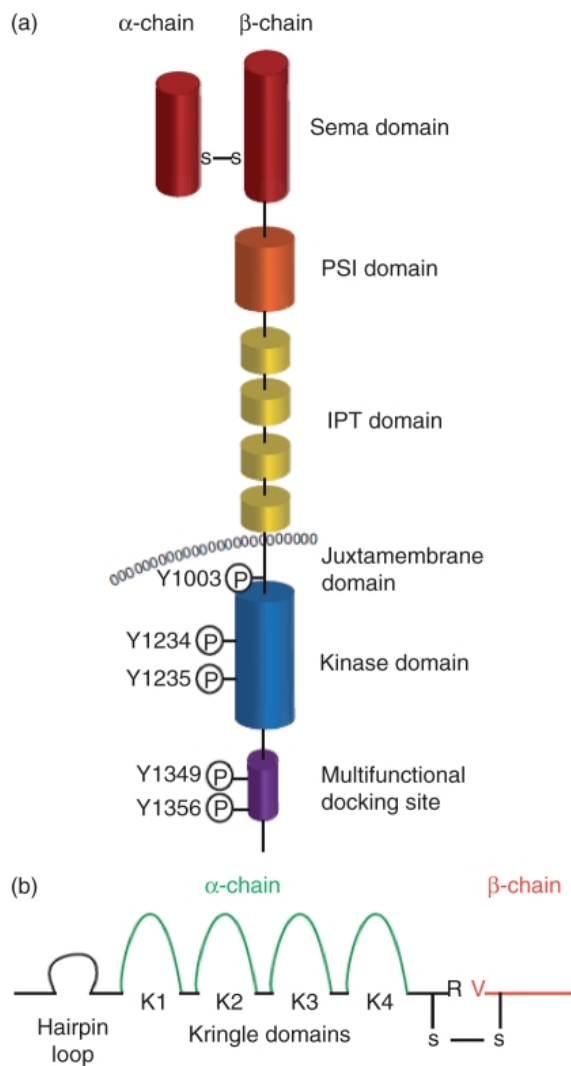


Abb. 3) Domänenstruktur von a) Met und b) seines Liganden HGF

a) Dargestellt ist die Heterodimerstruktur des Met-Rezeptorproteins mit der α - sowie β -Kette, den drei extrazellulären Domänen Sema, PSI und IPT. Im intrazellulären Teil bildet eine Kinase-Domäne das Zentrum, das von einer Juxtamembran-Domäne sowie verschiedener carboxyterminaler Sequenzbereiche flankiert wird.

b) Der Met-Ligand HGF besteht aus einer α - sowie β -Kette, die über eine Disulfidbindung verbunden sind. Die α -Kette enthält einen hairpin loop, an den sich vier Kringle-Domänen (K1-K4) anschließen. Die β -Kette besitzt eine den Gerinnungs-Serinproteinasen analoge Struktur, allerdings keine katalytische Aktivität (modifiziert nach Comoglio et al. 2008 sowie Organ und Tsao 2011).

2. Einleitung

2.3.2 Aktivierung

Der Aktivierungsmechanismus von Met wird durch die Bindung von HGF an die α - und β -Kette eingeleitet, in deren unmittelbarer Folge eine Oligomerisierung von Met-Molekülen erfolgt. Hierdurch kommt es zur Trans-Autophosphorylierung der Tyrosinreste Y¹²³⁴ und Y¹²³⁵ und nachfolgend zur Aktivierung des Enzyms (Naldini et al. 1991c, Rodrigues und Park 1994, Longati et al. 1994, Furge et al. 2000). An der C-terminalen Substratbindungsstelle der β -Kette findet dabei die Phosphorylierung der AS Tyr¹³⁴⁹ und Tyr¹³⁵⁶ statt. Anschließend werden Bindungsstellen für verschiedenste Signalmoleküle wie ERK/MAP-Kinase, Akt/PKB, p85-PI3K, p60Src generiert (Ponzetto et al. 1994).

2.3.3 Signalweiterleitung/Signalterminierung

Die Rezeptortyrosinkinase Met nimmt im Signalingnetzwerk zahlreicher Zellarten eine Schlüsselstellung ein, da sie an der Aktivierung und Regulation wichtiger Enzyme wie GTPasen, Kinasen, Cadherin E, Transkriptionsfaktoren und Adapterproteinen beteiligt ist (Birchmeier et al. 2003, Matteucci et al 2006).

Wie in Abbildung 4 (s. nächste Seite) dargestellt, kann Met zahlreiche Adapter- und Effektorsysteme beeinflussen, die ihrerseits die Aktivierung verschiedener, an der Regulation von Zellproliferation, -motilität und -überleben beteiligter Signalwege, initiieren können (Birchmeier et al. 2003, Trusolino et al. 2010, Organ und Tsao 2011). Ein interessanter Aspekt im Signaling von Met betrifft dessen Interaktion mit anderen Membranrezeptoren (wie $\alpha 6 \beta 4$ -Integrin, Semaphorin, Plexin B1, E-Cadherin, CD44, FAS und andere Tyrosin-Kinase-Rezeptoren wie RON, EGFR und ErbB2), wobei diese offensichtlich als Corezeptoren fungieren (Maulik et al. 2002, Bertotti und Comoglio 2003, Corso et al. 2005). Im Hinblick auf die vorliegende Arbeit ist wesentlich, dass es auch erste Hinweise für einen Rezeptor-Crosstalk von Met mit GPCR, darunter auch den Proteinase-aktivierten Rezeptoren, gibt (Kaufmann et al. 2009).

2. Einleitung

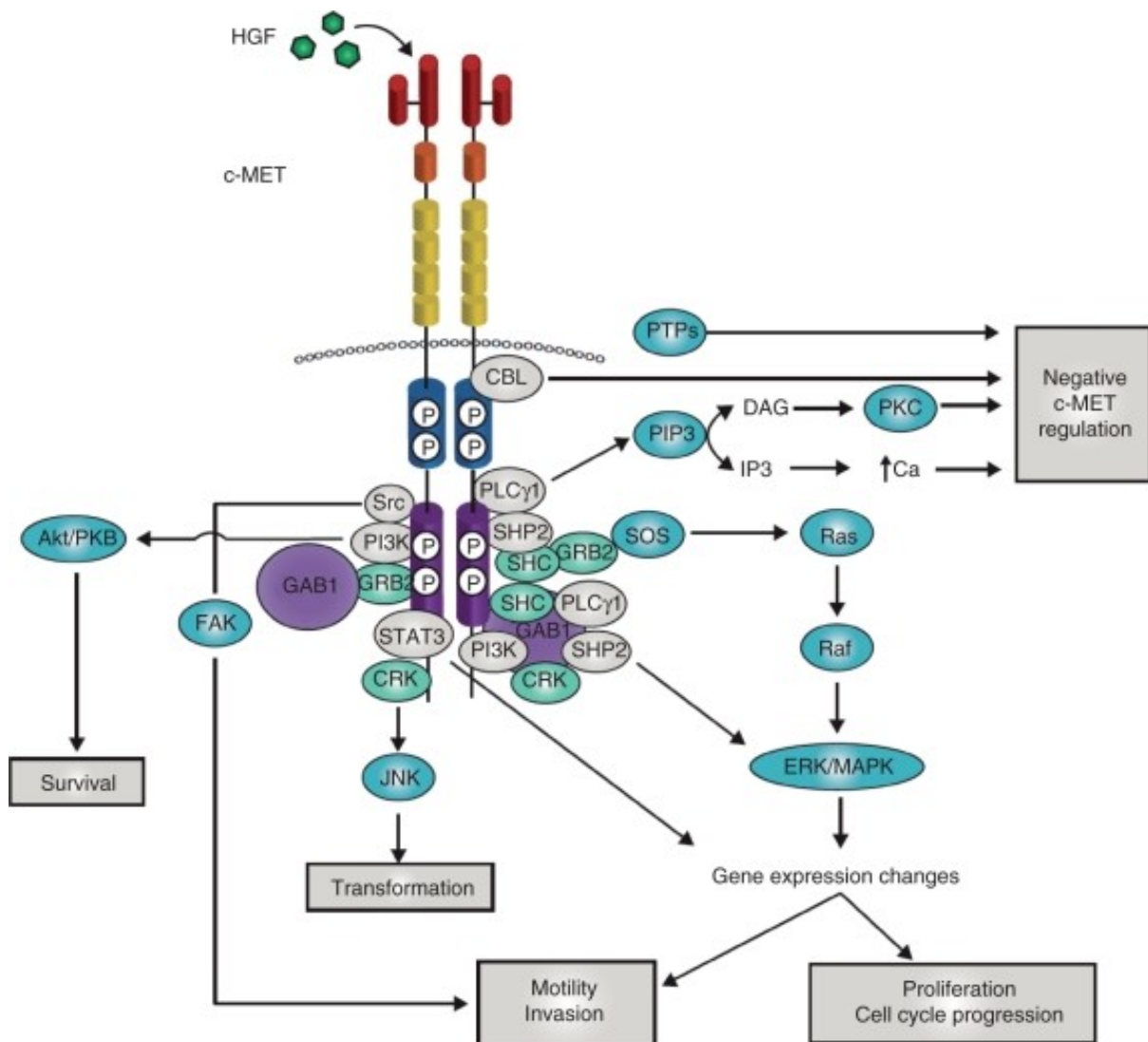


Abb. 4) Schematische Darstellung des intrazellulären Netzwerks der RTK Met

Nach Phosphorylierung im intrazellulären Bereich des Met-Moleküls kommt es zur Rekrutierung von Adaptorproteinen (growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), src homology 2 domain-containing protein (SHC); v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog, CRK und CRK-like (CRKL) sowie der Effektorsysteme PI3K, PLCγ und Src, der src homology 2 domain-containing 5' inositol phosphatase (SHIP2) sowie STAT3. Über diese Adaptor- sowie Effektorsysteme ist Met in der Lage verschiedene Signalwege zu initiieren. Dies betrifft u. a. den Ras/Raf/ERK/MAP-Kinase-Pathway, der an der Regulation von Zellproliferation, -motilität und Zellzyklus beteiligt ist und die PI3K/Akt/Proteinkinase B-Signalachse, die in erster Linie das Zellüberleben steuert. Zur Terminierung des Rezeptorsignals sind verschiedene Mechanismen wirksam, die durch PTPs, Cbl, PLC, PKC reguliert werden und die zur Rezeptorinaktivierung führen (modifiziert nach Birchmeier et al. 2003, Trusolino et al. 2010, Organ und Tsao 2011).

2. Einleitung

Zur Beendigung des Met-Signaling durch Rezeptor-Inaktivierung sind verschiedene Proteinphosphatasen wirksam (Palka et al. 2003, Machide et al. 2006, Sangwan et al. 2008), wobei u. a. Hinweise für eine hohe Relevanz der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP1B) und der T-Zell-Phosphatase (TCPTP) vorliegen, die mit den Tyrosinresten Y¹²³⁴ und Y¹²³⁵ in der intrazellulären Kinase-Domäne des Met-Moleküls interagieren (Sangwan et al. 2008). Met kann ebenfalls durch die PLC oder Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinasen inaktiviert werden, wobei dieser Inaktivierungsmechanismus durch eine Phosphorylierung von Ser⁹⁸⁵ in der Juxtamembran-Domäne mit nachfolgender Downregulierung der Rezeptor-Kinase-Aktivität gekennzeichnet ist (Gandino et al. 1994). Ein weiterer wesentlicher Inaktivierungsmechanismus wird durch die E3-Ubiquitin-Ligase Cbl gesteuert, die in einer dualen Funktion durch Regulation der Endozytose und der Ubiquitinierung von Met deren Daueraktivierung verhindert (Trusolino und Comoglio 2002, Peschard et al. 2001).

2.3.4 Funktionen

Physiologisch ist Met für die Entwicklung des sog. cell-scattering-Phänotyps verantwortlich (Zhu et al. 1994). Dieser Prozess, der die Zerstörung der Cadherin-abhängigen Zell-Zell-Kontakte mit nachfolgender Zellmotilität umfasst, ist von elementarer Bedeutung für Embryogenese, Regeneration und Wundheilung (Corso et al. 2005, Maulik et al. 2002, Huh et al. 2004, Chmielowiec et al. 2007). So greift Met während der Embryonalphase in die Steuerung morphogenetischer und angiogener Regulationsmechanismen ein und ist auch an Knochenremodeling und Nervenentwicklung beteiligt (Birchmeier und Gherardi 1998). Zudem ist seine motogene Funktion beispielsweise insbesondere bei der Wanderung von Skelettmuskel-Vorläuferzellen wesentlich (Bladt et al. 1995).

2.3.5 Met und Tumorentstehung und -progression

Met wurde ursprünglich in den 1980er Jahren als Onkogen identifiziert (Cooper et al. 1984) und die Untersuchungen der letzten Jahrzehnte zeigen, dass Met onkogene Effekte von HGF vermittelt (Bottaro et al. 1991, Naldini et al. 1991a, Rubin et al. 1993, Zarnegar und Michalopoulos 1995). Protoonkogen wirken Überexpression,

2. Einleitung

Mutation oder autokrine Koexpression von HGF und Met in einer Zelle sowie chromosomales Rearrangement und ligandenunabhängige Aktivierung durch Zelladhäsion und Apoptoseresistenz (Rong et al. 1992, Jeffers et al. 1996, Ramirez et al. 2000) Mutationen von Met und HGF konnten bereits in einer Vielzahl von Tumorarten nachgewiesen werden, wobei dies am überzeugendsten für papilläre Nierenkarzinome gezeigt werden konnte (Olivero et al. 1999, Schmidt et al. 1999). Ebenso wurde ein aberrantes HGF/Met-Signaling für Malignome des Urogenitalsystems, des oberen und unteren Gastrointestinaltrakts, der Schilddrüse, des Endometriums, des Pulmonalsystems, des Kopfes und Halses sowie bei Osteosarkomen, Rhabdomyosarkomen, Kaposi-Sarkomen, Leiomyosarkomen und hämatopoetischen Tumoren sowie für nicht-kleinzellige Lungenkarzinome beschrieben (Houldsworth et al. 1990, Kuniyasu et al. 1992, Hara et al. 1998, Miller et al. 2006, Bean et al. 2007, Engelman et al. 2007). Weiterhin fanden sich Met-abhängige Mechanismen bei Melanomen, dem Wilms-Tumor der Niere sowie Gliomen und Astrozytomen (Peruzzi und Bottaro 2006). Bezüglich des Cholangiokarzinoms konnte gezeigt werden, dass das HGF-Met-System an der Tumorzellinvasion beteiligt ist und somit offensichtlich bei der Progression dieses epithelialen Tumors eine Rolle spielt (Leelawat et al. 2006). Die eigene Gruppe konnte nachweisen, dass Met in das migratorische Signaling von PAR₂ in HCC-Zellen involviert ist, so dass eine Funktion dieses Signalweges bei der Progression dieser Tumorentität sehr wahrscheinlich ist (Kaufmann et al. 2009).

3. Zielstellung

Die eigene Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit längerem mit Proteinase-aktivierten Rezeptoren. Seit 2005 erfolgt dies mit einem Fokus auf deren Funktion im hepatozellulären Karzinom, wobei für PAR₂ ein neuartiger Signalweiterleitungsmechanismus entdeckt werden konnte, der eine so genannte Transaktivierung des HGF-Rezeptors Met einschließt und der an der Regulation der Migrations- und Invasionskapazität von HCC-Zellen beteiligt ist. Daraus wurde auf eine Rolle von PAR₂ bei der Progression des hepatozellulären Karzinoms geschlossen.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde das PAR-Untersuchungskonzept auf einen weiteren Lebertumor, das Cholangiokarzinom, ausgedehnt. Es sollte geklärt werden, ob PAR₂ auch in primär kultivierten Cholangiokarzinomzellen vorkommt und die Migration dieser Tumorzellart über eine Wechselwirkung mit der Rezeptortyrosinkinase Met beeinflusst.

Um die Interaktion von PAR₂ mit Met zu charakterisieren, waren Migrationsuntersuchungen mit Met-Inhibitoren sowie solche zur Met-Phosphorylierungsaktivierung vorgesehen.

Für die Experimente sollten neben der Serinproteinase Trypsin der PAR₂-selektive Peptidagonist 2-furoyl-LIGRLO-NH₂ sowie der PAR₂-selektive palmitoylierte Peptidantagonist P2pal-18S (palmitoyl-RMLRSSAMDENSEKKRKRAIK-NH₂) Verwendung finden.

4. Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
- Agarose 2 %	Life Technologies, Paisley, Schottland
- Ammoniumpersulfat (APS)	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
- AmnioMax TM -C100 Basal Medium (1x)	Gibco TM , Paisley, Schottland
- AmnioMax TM -C100 Supplement	Gibco TM , Paisley, Schottland
- AMV/Tfl 5x Reaction Buffer	Promega Corporation, Madison, USA
- AMV Reverse Transcriptase	Promega Corporation, Madison, USA
- Anti-Met C28, rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
- Anti-Met H 190, rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
- Anti-p-Met (Tyr1230/1234/1235), rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
- Bacitracin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- β -Actin-Primer	Gibco BRL Life Technologies
- Bromphenol Blue	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Buffer RLT, Lysis buffer	Quiagen GmbH, Hilden
- Buffer RPE, Wash buffer	Quiagen GmbH, Hilden
- Buffer RW1, Wash buffer	Quiagen GmbH, Hilden

4. Materialien und Methoden

- Centrifuge Tubes, 15 ml	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Collagenase Type: CLS	Biochrom AG, Berlin
- Cryo Tube™ Vials Nunc™	Brand Products, Roskilde, Dänemark
- DC Protein Assay: Reagent A, B, S	Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning
- Deoxycholic acid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
- DNA Molecular Weight Marker XIV, 100 base pair ladder	Roche Diagnostics GmbH, Steinheim
- ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont Buckinghamshire, UK
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Elektrophorese-Pipettenspitzen	Sorenson™, Bio Science Inc., Salt Lake City, USA
- Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Ethanol absolut	AppliChem GmbH, Darmstadt
- Filterpapier	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
- Flüssiger Stickstoff	Linde, Leuna
- Gel-Blotting-Papier, 300x600 mm	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
- Gewebekulturflaschen Cellstar®, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Gewebekulturplatten Cellstar®, 6-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Giemsa-Farbstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim
- Glycerin, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

4. Materialien und Methoden

- Glycin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Goat-anti-rabbit IgG, HRP conjugated	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
- Handschuhe Gentle Skin® classic	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden
- Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- isotone Lösung ISOTON® II	Beckman Coulter (Euro Diagnostics) GmbH, Krefeld
- Kodak Biomax MR Film, Scientific Imaging Film, 13x18 cm	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
- Kollagen, rat tail, 0,05 %	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Kryoröhrchen	Nalgene, Rochester, USA
- Küvetten, 10x4x45 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- Leupeptin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
- 2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Microtube Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Mitomycin	Calbiochem, San Diego, USA
- Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Natriumfluorid	Merck KGaA, Darmstadt
- Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt

4. Materialien und Methoden

- Natrium-Orthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Objektträger	Menzel GmbH & Co KG , Braunschweig
- PAR ₂ -Primer	Gibco BRL Life Technologies
- PBS-Dulbecco (1x)	Biochrom AG, Berlin
- Pepstatin A	Merck KGaA, Darmstadt
- PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Polycarbonate membranes, 8 µm pore, 25x80 mm	Neuro Probe Inc., Gaithersburg MD, USA
- Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (Marker)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning
- ProteinauftragsPuffer Roti®-Load 1 (4fach-Konz.)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- QIAshredder Mini Column	Quiagen GmbH, Hilden
- QIAshredder™ (250)-Kit	Quiagen GmbH, Hilden
- RNase-free Water	Quiagen GmbH, Hilden
- RNeasy Mini Column	Quiagen GmbH, Hilden
- Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- RPMI-1640-Medium (1x)	Biochrom AG, Berlin
- Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

4. Materialien und Methoden

- SDS ultra pure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Sterilium Händedesinfektionsmittel	Bode Chemie Hamburg
- SybrGreen	Rockland, ME, USA
- Temed p.a. (99 %)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Tfl DNA Polymerase	Promega Corporation, Madison, USA
- Trans-Blot® Transfer Medium	Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning
- Trasylol® 500 000 KIE (Wirkstoff: Aprotinin)	Bayer Vital, Leverkusen
- Tris Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Triton® x-100	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg
- Trypsin (1:250)	Biochrom AG, Berlin
- Trypsin-EDTA Solution (0,05 % / 0,02 %) in PBS	Biochrom AG, Berlin
- Tween 20®	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
- Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

4.1.2 Rezeptoragonisten und -antagonisten

PAR₂-aktivierendes Peptid (PAR₂-AP):

2-furoyl-LIGRLO-NH₂: selektiver PAR₂-Agonist / PAR₂-AP

4. Materialien und Methoden

PAR₂-Antagonist und negatives Kontrollpeptid:

P2pal-18S:	PAR ₂ -selektiver Antagonist (palmitoyl-RSSAMDENSKKRKSAIK-NH ₂)
RP-P2pal	negatives Kontrollpeptid (palmitoyl-KIASKRKKESNEDMASSR-NH ₂)

Die Peptide wurden von Dr. R. Kaufmann (Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, UK Jena) in Zusammenarbeit mit Dr. P. Henklein (Institut für Biochemie, Charité, Berlin) mittels Festphasensynthese hergestellt.

4.1.3. Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

Agarose-Gel (2 %ig):	20 g/l Agarose, (SybrGreen Verdünnung 1:10 000) in TAE-Puffer
APS-Lösung:	100 g/l APS in Aqua dest.
Blocklösung (Blotto):	1 g/l BSA und 10 g/l Milchpulver in TBS-T- Pufferlösung
BSA-Lösung:	1 g/l BSA in LysisPuffer
Einfriermedium:	Amniomax + Supplement (90 Vol.-%), DMSO (10 Vol.-%)
Giemsa-Färbelösung:	100 mg Giemsa Farbstoff ad 100 ml Methanol
LysisPuffer:	5 g/l Deoxycholat, 1 g/l SDS, 10 ml/l Triton 100 in PBS
PBS-Puffer:	8,77 g/l NaCl, 1,29 g/l NaH ₂ PO ₄ , 0,235 g/l NaH ₂ PO ₄ H ₂ O in 1 l Aqua dest. gelöst

4. Materialien und Methoden

Probenpuffer PCR-Agarosegele:	0,05 % Bromphenolblau, 50 % Glycerin, 0,2 % SDS
SDS-LaufPuffer:	14,4 g/l Glycin, 1 g/l SDS, 3,03 g/l Tris Ultra in Aqua dest.
SDS-Lösung:	100 g/l SDS in Aqua dest.
SDS-PAGE-Sammelgel:	4 % Acrylamid, 0,05 % APS, 0,1 % SDS, 0,1 % Temed, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
SDS-PAGE-Trenngel:	10 % Acrylamid, 0,05 % APS, 0,1 % SDS, 0,5 % Temed, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8
Stripping-Puffer:	100 mM 2-Mercaptoethanol, 2 % SDS, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7 in Aqua dest.
TAE-Puffer:	0,001 M EDTA, 0,114 Vol.-% Eisessig, 0,04 M Tris Ultra
TBS-Pufferlösung:	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl
TBS-T-Pufferlösung:	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0,05 % Tween
TransferPuffer:	192 mM Glycin, 20 Vol.-% Methanol, 25 mM Tris Ultra
Tris-HCl-Puffer (0,5 M):	181,7 g Tris Ultra in Aqua dest. mit 1 M HCl auf pH 6,8 eingestellt
Tris-HCL-Puffer (1,5 M):	60,6 g Tris Ultra in Aqua dest. mit 1 M HCl auf pH 8,8 eingestellt

4. Materialien und Methoden

Tris-Puffer (pH 7,6): 21,9 g NaCl, 17,1 g Tris-HCl, 2,25 g Tris-Base,
2,5 ml Tween auf 2,5 l mit Aqua dest.

auffüllen

Zellkulturmedien: AmnioMaxTM-C100 Basal Medium + Supplement
RPMI 1640 (ohne FKS)

4.1.4. Geräte

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
- -20 °C Kühlschrank: Premium no-frost	Liebherr
- -4 °C Kühlschrank, Modell S 8140S	Bomann
- -86 °C Kühlschrank: -86 °C FREEZER, Modell 917	Forma Scientific, Inc., Ohio, USA
- Abflamngerät flammy S	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen
- Autoclave-Steam Sterilizer 2540 EL	Tuttnauer Europe
- Auto-Pipetierhilfe Pipetus®-akku	Hirschmann-Laborgeräte
- Begasungsbrutschrank BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau
- Coulter Z2, Particle count & size analyzer	Coulter Electronics LTD, England
- Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
- Filmkassette X-omatic cassette	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
- Gefriercontainer	Nalgene, Rochester, USA

4. Materialien und Methoden

- Magnetrührer IKAMAG® REO	IKA®-Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen i. Br.
- Mikroskop Axiolab	Carl Zeiss Analytik Jena GmbH, Jena
- Mikroskop Invers Durchlichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Analytik Jena GmbH, Jena
- Mini Centrifuge C-1200	National Labnet Co., Woodridge, USA
- Mini PROTEAN 3 Electrophoresis Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning
- Minishaker MS1	IKA® Works, Inc., Wilmington, USA
- Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning
- Neuro Probe 48-well Chemotaxiskammer (AP 48)	Neuro Probe Inc., Gaithersburg MD, USA
- PCR-Elektrophoresekammer, Modell Nr. BM 100	Boehringer Ingelheim Bioproducts- Partnership, Heidelberg
- PCR-Stromversorgungsgerät	Boehringer Ingelheim Bioproducts- Partnership, Heidelberg
- Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ-Research, NC., Massachusetts, USA
- pH-Meter 320	Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
- Pippetierhilfe 2/10/20/100/200/1000 µl	ABIMED, Langenfeld
- Schütteleinrichtung	Unimax, Heidolph

4. Materialien und Methoden

- Spekol UV-VIS	Carl Zeiss Analytik Jena GmbH, Jena
- Stickstoffbehälter MVE XC 34/18	MVE, Inc., Burnsville, USA
- Thermoblock	Boekel Scientific, Emersacker
- Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Osterode
- Transilluminator Image Master® VDS	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
- Waage AC 211S	Sartorius AG, Göttingen
- Waage LC 621S	Sartorius AG, Göttingen
- Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Osterode

4.2 Methoden

4.2.1 Die CCC-Primärkultur 787

Für die Untersuchungen wurde die CCC-Primärkultur 787 (CCC-787), die im Forschungslabor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie des UK Jena aus dem Tumorgewebe eines Patienten mit einem Cholangiokarzinom etabliert worden war, verwendet. Bei diesem Tumor handelte es sich um ein CCC mit zylindrischen bis kubischen Epithelzellen, die von einem klaren bis leicht eosinophilen granulären Zytoplasma umgeben waren. Die Zellkerne waren relativ klein und vesikulär gestaltet. Das nicht neoplastische Lebergewebe wies eine mäßiggradige portalfeldbezogene Entzündung auf, zusätzlich war eine milde, grobtropfige Verfettung vorhanden. Der Tumor wies weiterhin eine mäßiggradige Differenzierung entsprechend einem Malignitätsgrad 2 auf. Da im Forschungslabor ausreichend Kryoproben der CCC-787-Primärkultur vorhanden waren, wurden ausschließlich Zellen der 1.–5. Passage für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendet. Zudem waren die Zellen hinsichtlich ihres epithelialen Ursprungs immunzytochemisch mit Hilfe des Anti-Cytokeratin-Antikörpers MNF 116 (Fa. DAKOCytomation) sowie zum Ausschluss einer

4. Materialien und Methoden

Myofibroblasten-Kontamination mit Hilfe des gegen glattes Muskelaktin gerichteten Antikörpers 1A4 (Fa. DAKOCytomation) bereits charakterisiert worden.

4.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Die Kultur der CCC-787-Zellen erfolgte in Schräghals-Zellkulturflaschen unter konstanten Bedingungen (CO₂-Inkubator, wassergesättigte Atmosphäre mit 5 % CO₂-Anteil bei 37 °C). Als Nährmedium diente Amniomax mit Supplement. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer Sterilbank. Nach etwa 3–4 Tagen erfolgte ein Austausch des Zellkulturmediums. Hierfür wurde das Medium mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen in 5 ml PBS gewaschen, wobei die Zellkulturflasche leicht geschwenkt wurde. Nach der Entfernung des PBS wurden 5 ml frisches Amniomax + Supplement in die Zellkulturflasche pipettiert. Das Passagieren der Zellen wurde vorgenommen, wenn ein Zellrasen mit ca. 80 %-iger Konfluenz beobachtet werden konnte. Nach Absaugen des Nährmediums aus der Zellkulturflasche wurden die Zellen einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Nach erneutem Absaugen erfolgte die Trypsinierung mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C für 90–120 Sekunden. Der Ablösevorgang der Zellen wurde durch leichtes Beklopfen der Zellkulturflasche unterstützt und anschließend lichtmikroskopisch auf Vollständigkeit überprüft. Die Zellsuspension wurde danach in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und nach Zentrifugation bei Raumtemperatur (900 U/min, 5 min) und Absaugen des PBS-Überstandes wurde das Zellpellett in Zellkulturmedium resuspendiert und zur Weiterkultivierung in eine neue Zellkulturflasche bzw. für ein Experiment in 6-Well-Platten eingesät.

4.2.1.2 Einfrieren der Zellen, Kryokonservierung

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Dafür wurden die aus den Zellkulturflaschen abgelösten Zellen nach Zentrifugation in Amniomax + Supplement (plus 10 % DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen pipettiert, anschließend über Nacht in einem speziellen Gefriercontainer im Tiefkühlschrank bei -80 °C eingefroren und am darauf folgenden Tag zur Lagerung in einen Flüssigstickstoff-Kryobehälter überführt.

4. Materialien und Methoden

4.2.1.3 Auftauen der Zellen

Zunächst wurde pro aufzutauender Zellprobe eine Zellkulturflasche mit 4 ml Amniomax + Supplement im CO₂-Inkubator vortemperiert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstoff-Kryobehälter entnommen, in einem Wasserbad bei 37 °C rasch erwärmt und jeweils in die vorbereitete Zellkulturflasche pipettiert. Zur Entfernung des im Medium vorhandenen DMSO wurde das Zellkulturmedium am darauf folgenden Tag (nach Anheften der Zellen am Boden der Zellkulturflasche) abgesaugt, anschließend erfolgte das Waschen der Zellen mit 5 ml PBS sowie Zugabe von neuem Zellkulturmedium (Amniomax + Supplement).

4.2.2 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde das Zellzählgerät „Coulter Z2“ verwendet. Zusätzlich war es notwendig, die Vitalität der Zellen zu bestimmen. Dies erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zellzählkammer. Dabei wurde das Verhältnis von vitalen zu toten Zellen an einem Aliquot der Zellsuspension mit Hilfe Trypanblaufärbung sowie Auszählen der Zellen am Mikroskop bestimmt. Dabei erschienen die lebenden Zellen hell durchscheinend, da Trypanblau nicht durch die intakte Membran vitaler Zellen eindringen kann. Dagegen waren tote Zellen durch ihre intensive blaue Färbung zu erkennen, da das Trypanblau über die geschädigte Membran in die Zelle gelangt. Für die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Experimente wurden nur Zellkulturen mit einem Anteil von mindestens 95 % lebender Zellen verwendet.

4.2.3. Gesamt-RNA-Isolation

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus CCC-787-Zellen wurde der RNeasy®-Mini-Kit der Fa. Qiagen GmbH, Hilden, verwendet. Dabei erfolgten alle experimentellen Schritte gemäß dem Herstellerprotokoll, wobei die RNA-Konzentration mittels Spektr. UV-VIS bei 260 nm spektrofotometrisch bestimmt wurde. Für die weiteren Arbeiten mit den RNA-Proben wurden jeweils 50 ng verwendet.

4.2.4 RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Für die reverse Transkription sowie Amplifikation der PAR₂-RNA wurde das Access-RT-PCR-System der Firma Promega verwendet. Durch Kombination der

4. Materialien und Methoden

AMV Reverse Transkriptase mit der *Thermus flavus* DNA-Polymerase in einem optimierten Puffersystem bietet dieses System den Vorteil, dass nur ein Reaktionsansatz benötigt wird, um die RNA in cDNA umzuschreiben, den Komplementärstrang zu hybridisieren und zu amplifizieren. Neben der dadurch vereinfachten Handhabbarkeit ergibt sich zudem eine Reduzierung des Kontaminationsrisikos, wie dies bei anderen Systemen, z. B. durch wiederholtes Öffnen der Reaktionsgefäße, während mehrfacher Reagenzienzugabe besteht.

Es wurden folgende PAR₂-spezifische Primer verwendet:

PAR₂ (sense): 5' – TGG ATG AGT TTT CTG CAT CTG TCC – 3'

(anti-sense): 5' – CGT GAT GTT CAG GGC AGG AATG – 3' und die

PCR-Amplifikation wurde in 32 Zyklen (30 s bei 94 °C, 30 s bei 55 °C, 30 s bei 72 °C und abschließend 5 min bei 72 °C) durchgeführt (Nickel et al. 2006).

Der Nachweis der PAR₂-PCR-Produkte erfolgte mittels Gel-Elektrophorese (Agarose-Gel 2 %-ig, 0,2 µg/ml SybrGreen). Dazu wurden 6 µl der jeweiligen PCR-Probe mit 2 µl Probenpuffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Nach der Elektrophorese (TAE-Puffer, 1 h bei 100 V) erfolgte die Visualisierung der PCR-Fragmente auf dem Agarosegel unter einem UV-Transilluminator. Im Falle von PAR₂ handelte es sich um ein PCR-Fragment mit einer Größe von 490 bp.

4.2.5 Chemotaktische Migration

Chemotaxis bezeichnet die gerichtete Migration von Zellen zu Orten mit höheren Konzentrationen eines chemischen Stoffes, ein Verhalten welches alle beweglichen Zellen aufweisen (Caterina und Devreotes 1991).

Zur Bestimmung des Effekts einer PAR₂-Stimulation auf die chemotaktische Migration von CCC-787-Zellen wurde eine 48-Well Chemotaxis-Kammer der Fa. Neuro Probe Inc., Gaithersburg MD, USA, verwendet. Die Wells des Kammeroberteils wurden jeweils mit einer definierten Anzahl 17 h-gehungerter CCC-787-Zellen befüllt (im Falle der PAR₂- bzw. Met-Inhibierungsexperimente zusätzlich mit dem PAR₂-Antagonisten P2pal-18S bzw. dem Met-Inhibitor SU 11274 bzw. PHA 665752), das Kammerunterteil enthielt den chemotaktischen Stimulus Trypsin oder 2-furoyl-LIGRLO-NH₂. Zwischen beiden Kammern befand sich ein als Membranbarriere dienender, kollagenbeschichteter Polycarbonatfilter

4. Materialien und Methoden

(Porengröße: 8 µm). Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen, die durch den Filter migriert waren, durch Auszählen am Mikroskop erfasst. Der Polykarbonatfilter wurde über Nacht mit Kollagen (0,05 %) beschichtet und bei 4 °C gelagert. Zunächst wurden 27 µl RPMI-1640-Medium (ohne FKS) mit dem jeweiligen chemotaktischen Stimulus in jedes Well des Kammerunterteils pipettiert, die kollagenbeschichtete Membran aufgelegt, darauf das Kammeroberteil gesetzt und in jedes Well des oberen Teils 51 µl Zellsuspension (40 000 Zellen) pipettiert (im Falle der PAR₂- bzw. Met-Inhibierungsexperimente mit dem PAR₂-Antagonisten P2pal-18S bzw. dem Met-Inhibitor SU 11274 bzw. PHA 665752). Nach 6- bzw. 16-stündiger Migration der CCC-787-Zellen im CO₂-Inkubator bei 37 °C wurde die Migrationskammer auseinandergebaut und die Fixation der der Membran anhaftenden CCC-787-Zellen in 96 %-igem Ethanol sowie eine Färbung mit Giemsa-Lösung vorgenommen. Anschließend wurden die Zellen an der Membranoberseite mit einem Wattestäbchen abgewischt und die durch die Membranbarriere migrierten Zellen an der Membranunterseite mittels eines Axiolab Mikroskops der Fa. Carl Zeiss Analytik GmbH, Jena gezählt. Für die Auswertung wurden jeweils alle Zellen eines Wells erfasst.

4.2.6 Statistische Auswertung der Migrationsdaten

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der Migrationsexperimente erfolgte mit Hilfe des PC-Programmes SPSS 13 (Windows computer program, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA), wobei jeweils die Daten aus drei unabhängigen Experimenten herangezogen wurden (pro experimentellem Punkt 24 Werte). Da bei den Datenreihen keine Normalverteilung vorhanden war, wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

4.2.7 Präparation von CCC-787-Zelllysaten

Lysate der CCC-787-Zellen wurden für diejenigen Untersuchungen benötigt, bei denen der Effekt einer PAR₂-Stimulation auf die Met-Aktivierung mit Hilfe von Western Blotting untersucht wurde. Diese Experimente erfolgten in 6-Well-Platten.

4. Materialien und Methoden

Nach Kultivierung der CCC-787-Zellen in Amniomax + Supplement bis zum Erreichen einer etwa 80 %-igen Konfluenz, 17-stündiger Hungerphase in RPMI sowie nachfolgender Stimulation mit Trypsin oder dem PAR₂-Agonistpeptid 2-furoyl-LIGRLO-NH₂ (bzw. Stimulation nach Vorinkubation mit dem PAR₂-Antagonisten P2pal-18S) wurden die 6-Well-Platten zum Abstoppen der Reaktion auf Eis gebracht, das Medium abpipettiert und PBS + Proteinaseinhibitoren zugegeben. Als Inhibitoren dienten Aprotinin (EK 10µg/ml), Leupeptin (EK 2µg/ml), NaF (EK 1mM), Na₃VO₄ (EK 1mM), Pepstatin (EK 1µg/ml) und PMSF (EK 100µg/ml). Nach Absaugen des PBS erfolgte die Zugabe von 70 µl Lysispuffer und nach 5-minütiger Inkubationszeit wurden die Zellen in jedem Well mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt. Die so erhaltenen Zelllysate wurden in Microtube-Reaktionsgefäße pipettiert, kurz auf einem Vortexer intensiv gemischt und nach 5 min auf Eis 20 min bei 13.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Von den Überständen erfolgte jeweils an einem Aliquot eine Proteinbestimmung. Die restliche Suspension wurde mit Probenauftragungspuffer im Verhältnis 1:4 gemischt und sofort für weitere Experimente verwendet oder für eine spätere Verwendung zunächst bei -20 °C weggefroren.

4.2.8 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des Proteinbestimmungssystems DC-Protein-Assay der Fa. Bio-Rad. Dieser Assay basiert auf der Reaktion von Proteinen in einer alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung und dem Folin-Reagenz. Dabei erfolgt durch die kupferbehandelten Proteine eine Reduktion des Folin-Reagenz', die mit einer charakteristischen Blaufärbung (Absorptionsmaximum 750 nm) verbunden ist und zur quantitativen Proteinbestimmung genutzt wird (Lowry et al. 1951, Peterson 1979).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Messung mit Hilfe des Spektralphotometers UV-Vis (Carl Zeiss Jena) bei 750 nm, wobei zur Proteinquantifizierung eine Proteinbezugskurve, die auf der Grundlage der Messung von BSA-Lösungen definierter Konzentration erstellt worden war, verwendet wurde. Alle Proben wurden anschließend durch Zugabe von Aqua dest. auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt.

4. Materialien und Methoden

4.2.9 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Protein-Proben nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Hierfür wurden ein 10 %-iges Trenngel sowie ein 4 %-iges Sammelgel in einem 10-Kamm-System präpariert. Anschließend wurden die Proteinproben bzw. ein Molekulargewichtsmaker in die Kammtaschen aufgetragen. Nun erfolgte die Auftrennung der Proben in Laufpuffer (0,1 % SDS) in einer Bio-Rad Elektrophoresekammer. Dabei wurde für ca. 30–45 min eine Spannung von 150 V angelegt.

4.2.10 Bestimmung von p-Met mittels Western Blotting

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden diese mittels Western Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde ein Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell-System der Fa. Bio-Rad benutzt. Die Proteine wurden nach dem sog. Sandwich-System geblottet. Dabei wurde folgende Anordnung der Materialien verwendet: Fiberpad – Filterpapier – Gel – Nitrozellulosemembran – Filterpapier – Fiberpad. Die Trans-Blot-Kammer wurde mit Transferpuffer mit einer Temperatur von 4 °C gefüllt. Zur Aufrechterhaltung der Kühlung und der Zirkulation wurden ein Eiscontainer sowie ein Magnetrührer in die Trans-Blot-Kammer verbracht. Anschließend erfolgte der Blotvorgang über 30 min bei einer Spannung von 100 V. Im folgenden Arbeitsschritt wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran blockiert. Dafür wurde die Membran für 2 h bei Raumtemperatur in Blotto geschwenkt. Die sich anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper (anti-p-MET, Verdünnung 1:500 in Blotto) wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Nitrozellulosemembran in TBS überführt und 1 min mit ECL-Plus-Reagenz behandelt. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurden BioMax MR-Filme unter Ausnutzung von Chemolumineszenz verwendet. Bei diesem Detektionsprinzip bewirkt die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid im alkalischen Milieu die Oxidation von Luminol. Die dabei erzeugte Lichtemission führt zur Schwärzung des Films an den entsprechenden Stellen.

4. Materialien und Methoden

4.2.11 Membran-Stripping und Met-Blotting

Um zu überprüfen, ob die einzelnen Probenspuren gleichmäßig mit Met-Protein beladen waren, wurde ein Membran-Stripping sowie ein erneutes Blotten mit einer Mischung (1:1) der beiden polyklonalen Anti-Met-Antikörper H-190 und C-28 durchgeführt. Hierbei wurde die Standardvorschrift der Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Nach Entfernen des ECL-Reagenz' durch zweimal 15 min Waschen mit TBS-T wurde die Nitrozellulosemembran 30 min bei 50 °C in Strippingpuffer behandelt. Anschließend erfolgten zweimal Waschen mit TBS-T, Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen mit Blotto sowie Inkubation mit den Met-Primärantikörpern (Anti-Met H-190 und Anti-Met C-28, Mischungsverhältnis 1:1; Verdünnung 1:200). Die kombinierte Anwendung der Met-Antikörper H-190, der gegen eine extrazelluläre Domäne, und C-28, der gegen eine zytoplasmatische Region im Met-Molekül gerichtet ist, hatte sich in vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe als die optimale Variante für den Nachweis von Met herausgestellt. Als Sekundärantikörper diente, wie im Falle der Untersuchungen zu p-Met, Goat-anti-rabbit IgG HRP (Verdünnung 1:500 in Blotto) und die Visualisierung der Blot-Daten erfolgte wie für p-Met beschrieben (siehe 4.2.10).

4.2.12 Quantifizierung der Blot-Daten

Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe des Bildanalyseprogramms Image J 1.43 (National Institutes of Health).

5. Ergebnisse

5.1 PAR₂-Nachweis in CCC-787-Zellen

Die Expression von PAR₂ in CCC-787-Zellen wurde auf RNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht. Wie in Abbildung 5 dargestellt, war für PAR₂ eine einzelne Bande der erwarteten Fragmentgröße von 490 bp im Agarosegel nachweisbar. Ebenfalls lässt sich aus Abbildung 5 ablesen, dass in einem Kontrollansatz, der keine cDNA sondern lediglich die Primer enthielt, wie erwartet keine Bande im Agarosegel sichtbar war.

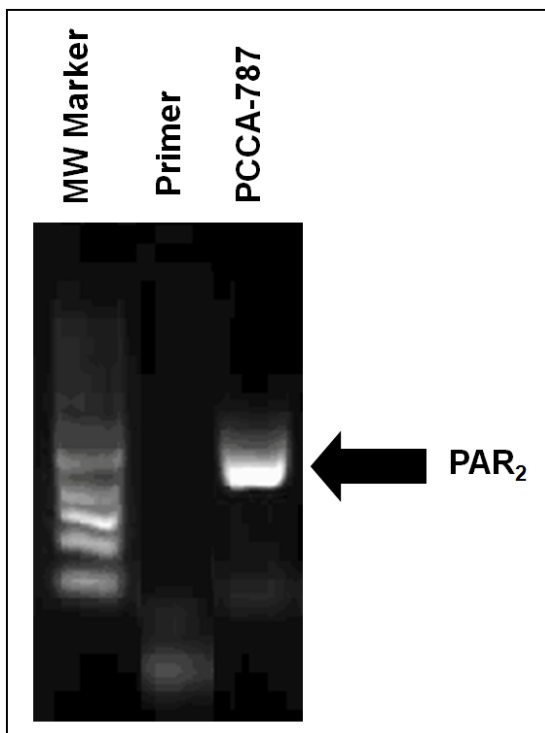


Abb. 5) Nachweis von PAR₂ in CCC-787-Zellen auf RNA-Level

Nach Extraktion von Gesamt-RNA aus 10⁷ CCC-787-Zellen erfolgte RT-PCR unter Verwendung PAR₂-spezifischer Primer. Die Auftrennung der PCR-Produkte wurde mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt und ein UV-Transilluminator zur Visualisierung der Ergebnisse genutzt. PCR-Reaktionen ohne Verwendung von cDNA, lediglich mit den PAR₂-spezifischen Primern, dienten als Negativkontrolle (Primer). Die Darstellung ist repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

MW Marker: Molekulargewichtsmarker

5.2 Die Serinproteinase Trypsin und das selektiv PAR₂-aktivierende Peptid 2-furoyl-LIGRLO-NH₂ stimulieren die Migration von CCC-787-Zellen, der PAR₂-Antagonist P2pal-18S hemmt diesen Effekt

Da die Fähigkeit von Tumorzellen zur erhöhten Migration eine wesentliche Voraussetzung für die Progression eines Tumors darstellt, wurde die Zellmigration als zellulärer Parameter für die Untersuchungen zur Funktion von PAR₂ in CCC-787-Zellen ausgewählt.

In diesen Experimenten, in denen die Bestimmung der Migration von CCC-787-Zellen durch eine kollagenbeschichtete poröse Polykarbonatmembran-Barriere in einer 48-Well-Migrationskammer der Fa. Neuro Probe erfolgte, wurden Effekte der Serinproteinase Trypsin, des selektiv PAR₂-aktivierenden Peptids 2-furoyl-LIGRLO-NH₂ sowie des selektiven PAR₂-Antagonisten P2pal-18S erfasst. Zusätzlich wurden negative Kontrollpeptide, 2-furoyl-OLRGIL-NH₂ für den PAR₂-Agonisten sowie P2pal-18S-RP (palmitoyl-KIASKRKESNEDMASSR-NH₂) für den PAR₂-Antagonisten, verwendet. Bei der Auswahl der experimentellen Parameter war weiterhin wichtig, dass mit 6 h bzw. 16 h Stimulationszeiten gewählt wurden, bei denen eine Verfälschung der Migrationsdaten durch Proliferationseffekte ausgeschlossen werden konnte.

Diese Untersuchungen ergaben, dass sowohl die Serinproteinase Trypsin (10 nM) als auch das PAR₂-AP 2-furoyl-LIGRLO-NH₂ (10 µM) in der Lage waren, die Migration von CCC-787-Zellen innerhalb von 6 h bzw. 16 h im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle signifikant zu steigern (Abbildung 6 A). Wie in Abbildung 6 B ersichtlich, war sowohl der Trypsin- als auch der PAR₂-AP-induzierte migratorische Effekt in CCC-787-Zellen durch den PAR₂-Antagonisten P2pal-18S (10 µM) vollständig hemmbar. (In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass P2pal-18S die Vitalität von CCC-787-Zellen in der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentration von 10 µg/ml nicht beeinflusste.) Zudem ergab sich, dass das negative Agonist-Kontrollpeptid PAR₂-RP (10 µM) nicht in der Lage war, die migratorische Kapazität von CCC-787-Zellen im Vergleich zum migratorischen Basalwert zu steigern und eine Vorinkubation der Zellen mit dem negativen Antagonist-

5. Ergebnisse

Kontrollpeptid P2pal-18S (10 μ M, 30 min) keinen Einfluss auf den migratorischen Effekt der beiden Agonisten Trypsin sowie PAR₂-AP hatte (Abbildung 6 B).

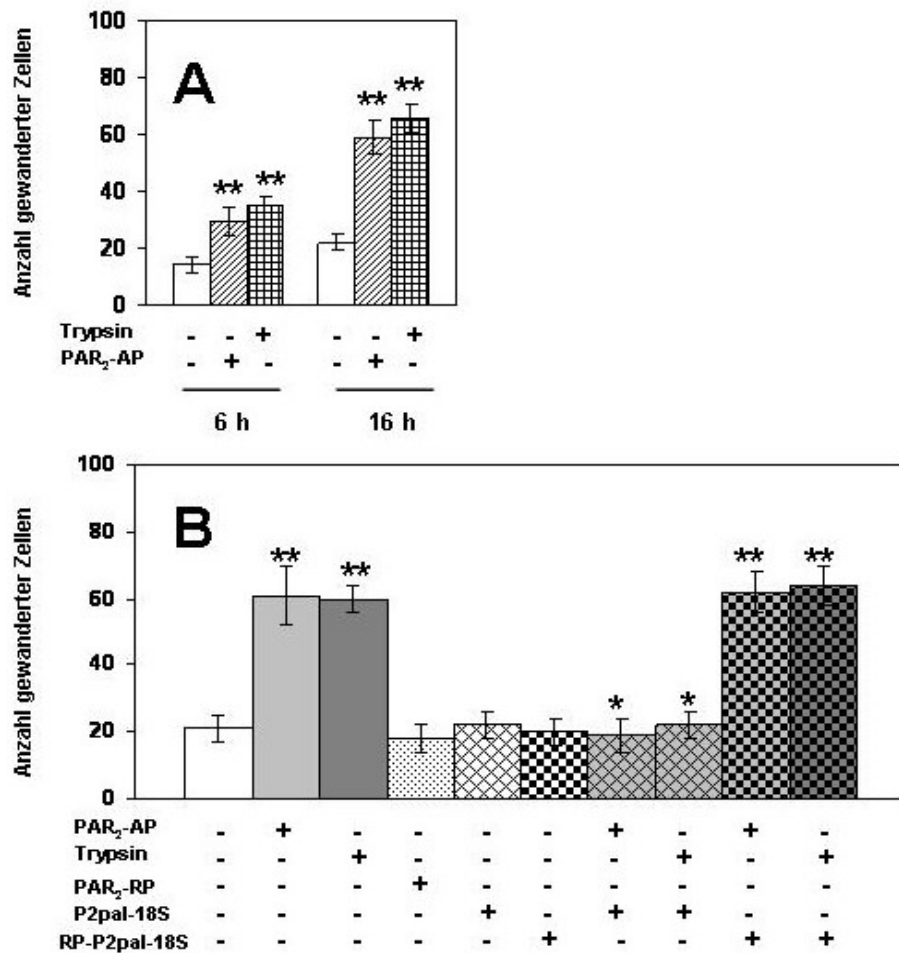


Abb. 6) PAR₂ vermittelt in CCC-787-Zellen einen migratorischen Effekt.

CCC-787-Zellen wurden nach 17 h Hungerphase (A) mit Trypsin (10 nM) bzw. PAR₂-AP (10 μ M) stimuliert, (B) mit dem Kontrollpeptid PAR₂-RP AP (10 μ M) 16 h stimuliert oder 1 h mit P2pal-18S (10 μ M) oder RP-P2pal-18S (10 μ M) vorinkubiert und mit Trypsin (10 nM) bzw. PAR₂-AP (10 μ M) 16 h stimuliert (im Falle der nichtstimulierten Kontrolle erfolgte die entsprechende Zugabe PBS). Die durch die poröse kollagenbeschichtete Polykarbonatmembran gewanderten Zellen wurden fixiert, mit Giemsa angefärbt und deren Anzahl durch Auszählen am Mikroskop ermittelt.

[Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von Messdaten (n=24) aus drei unabhängigen Experimenten. **p-Wert < 0,05 vs. nicht stimuliert: *p-Wert < 0,05 vs. Trypsin- bzw. PAR₂-AP-stimuliert (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test)]

5. Ergebnisse

5.3 Eine Inhibierung der RTK Met hemmt die Trypsin- sowie 2-furoyl-LIGRLO-NH₂-induzierte Steigerung der Migration von CCC-787-Zellen

Ausgehend von der Hypothese, dass die RTK Met in das migratorische Signaling von PAR₂ in Cholangiokarzinomzellen involviert ist, wurde der Effekt einer pharmakologischen Inhibierung von Met auf die Trypsin- sowie PAR₂-AP-induzierte Migrationssteigerung von CCC-787-Zellen untersucht. Um die Aussagefähigkeit der Resultate zu erhöhen, wurden für diese Experimente zwei verschiedene, als hocheffektiv charakterisierte, selektive Met-Inhibitoren, SU 11274 (Sattler et al. 2003) und PHA 665752 (Christensen et al. 2003), verwendet. Für die Inhibitoren war von der Arbeitsgruppe in vorangegangenen Experimenten mittels Trypanblaufärbung bereits nachgewiesen worden, dass diese in der jeweils verwendeten Dosierung (10 µg/ml SU 11274 bzw. 0,1 µg/ml für PHA 665752) keinen Einfluss auf die Vitalität von CCC-787-Zellen ausüben.

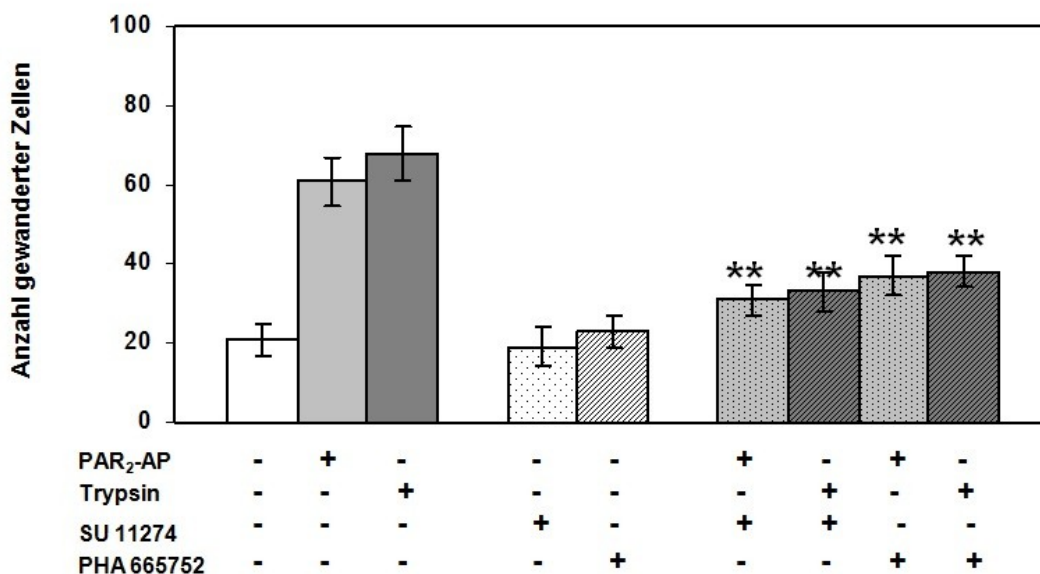


Abb. 7) Die Met-Inhibitoren SU 11274 und PHA 665752 hemmen den Effekt von Trypsin und PAR₂-AP auf die Migration von CCC-787-Zellen.

CCC-787-Zellen wurden nach 17 h Hungerphase 1 h mit SU 11274 (10 µM) oder PHA 665752 (0.1 µM) vorinkubiert und mit Trypsin (10 nM) bzw. PAR₂-AP (10 µM) 16 h stimuliert (im Falle der nichtstimulierten Kontrolle erfolgte die entsprechende Zugabe von PBS). Anschließend wurde experimentell vorgegangen, wie in der Legende der Abb. 7 (siehe oben) beschrieben. [Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von Messdaten (n=24) aus drei unabhängigen Experimenten. **p-Wert <0,05 vs. nicht stimuliert und vs. Trypsin- bzw. PAR₂-AP-stimuliert (Wilcoxon-Mann Whitney Test)]

5. Ergebnisse

Wie in Abbildung 7 dargestellt, waren sowohl SU 11274 als auch PHA 665752 in der Lage, den Effekt von Trypsin und des PAR₂-AP auf die Migration von CCC-787-Zellen partiell zu hemmen. Für SU 11274 betrug sowohl die Hemmung des Effekts von Trypsin als auch des PAR₂-APs ca. 72 %, für PHA 665752 war eine ca. 65 %-ige Inhibierung des Effekts beider PAR₂-Agonisten auf die Migration von CCC-787-Zellen zu beobachten. In Abbildung 7 ist weiterhin ersichtlich, dass beide Inhibitoren keinen Effekt auf die Basismigration von CCC-787-Zellen ausübten.

5.4 Trypsin und das PAR₂-AP 2-furoyl-LIGRLO-NH₂ induzieren in CCC-787-Zellen eine Aktivierung von Met

Die Resultate der pharmakologischen Hemmexperimente mit den Met-Inhibitoren SU 11274 und PHA 665752 erbrachten einen ersten Beleg für die Rolle von Met im migratorischen Signaling von PAR₂ in CCC-787-Zellen. Zur weiteren Bestätigung einer Rezeptorinteraktion zwischen PAR₂ und Met ging es nun darum, die PAR₂-vermittelte Met-Aktivierung zu charakterisieren. Da die Aktivierung der RTK Met mit deren Phosphorylierung verbunden ist, wurde dies an CCC-787-Zellen, die mit Trypsin oder dem PAR₂-AP 2-furoyl-LIGRLO-NH₂ behandelt wurden, mit Hilfe von Western Blotting unter Verwendung eines phosphospezifischen Anti-Met-Antikörpers untersucht.

Sowohl Trypsin als auch das PAR₂-AP induzierten in CCC-787-Zellen nach einer Inkubationszeit von 3 min eine deutlich verstärkte Phosphorylierung von Met (Abbildung 8 A und B). Für PAR₂ wurde zusätzlich die Konzentrationsabhängigkeit des Met-Phosphorylierungseffekts untersucht. Wie in Abbildung 8 B dargestellt, konnte der Effekt bereits bei einer Konzentration von 0.05 µM beobachtet werden, und dieser erreichte ein Maximum bei einer PAR₂-AP-Konzentration von 1.0 µM mit einer ca. 5fach erhöhten Met-Phosphorylierung im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Wie in Abbildung 8 weiterhin ersichtlich, ist der PAR₂-selektive Antagonist P2pal-18S in der Lage, den Effekt von Trypsin auf die Met-Phosphorylierung zu hemmen.

5. Ergebnisse

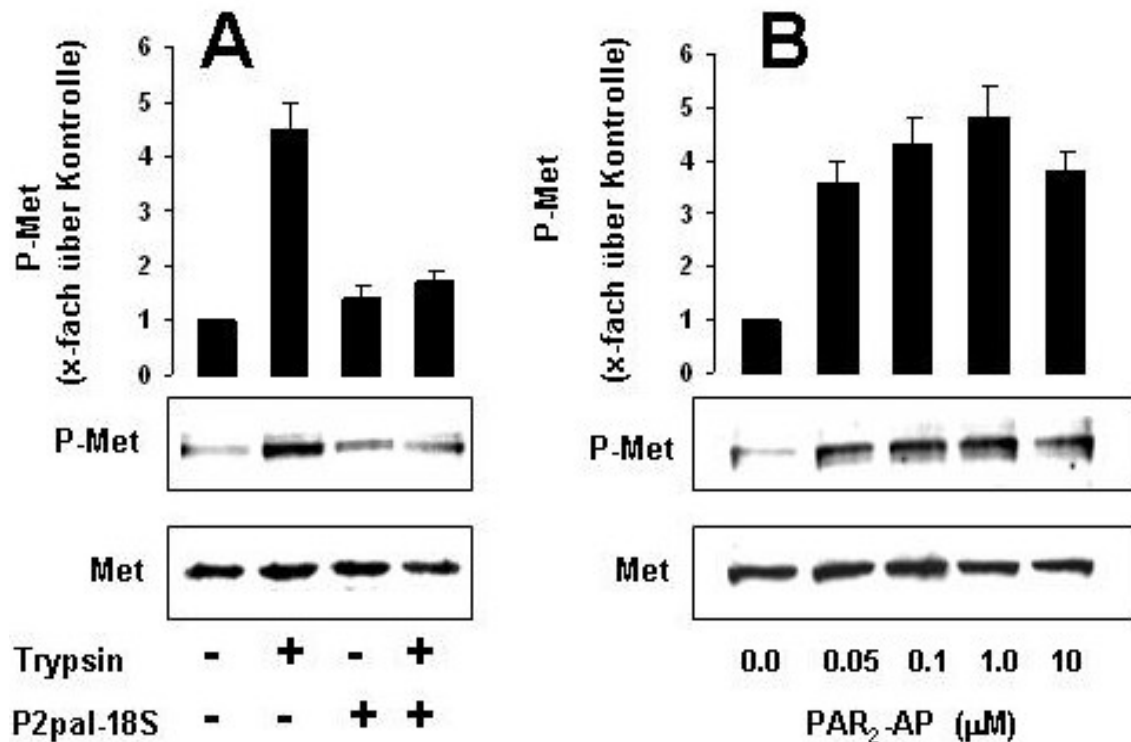


Abb. 8) PAR₂ vermittelt in CCC-787-Zellen eine Met-Aktivierung.

CCC-787-Zellen wurden nach 17 h Hungerphase in serumfreiem RPMI A) 3 min mit Trypsin (10 nM) stimuliert bzw. 1 h mit dem PAR₂-Antagonist P2pal-18S (10 μM) vorinkubiert und anschließend 3 min mit Trypsin (10 nM) stimuliert, B) 3 min mit 2-furoyl-LIGRLO-NH₂ in den angezeigten Konzentrationen stimuliert. Nach Zellyse, Elektrophorese und Western Blotting bzw. Stripping und Western Blotting wurden die Ergebnisse mittels Chemolumineszenz visualisiert und mit Hilfe von Image J 1.43 quantifiziert. In den Histogrammen oberhalb der Blots sind normalisierte Daten (phosphoryliertes Met/Gesamt-Met) von drei unabhängigen Experiments ± SD dargestellt. Es ist die Auswertung jeweils eines repräsentativen Experiments mit der Bestimmung von Gesamt-Met zur Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung gezeigt (verwendete Antikörper: rabbit polyclonal Anti-phospho-Met (pYpYpY1230/1234/1235; BioSource); Anti-Met, rabbit polyclonal Anti-Met (C-28), rabbit polyclonal Anti-Met (H-190); Sekundärantikörper: Goat-anti-rabbit IgG-HRP-conjugated).

6. Diskussion

Das Cholangiokarzinom ist nach dem hepatozellulären Karzinom das zweithäufigste Malignom der Leber und dies mit einer sehr deutlich steigenden Inzidenz in den westlichen Ländern innerhalb der letzten 10 Jahre (Lee et al. 2012). Die Prognose dieser Tumorerkrankung ist schlecht, der einzige kurative Ansatz bleibt weiterhin eine komplette Resektion des gesamten Gallentraktes, einschließlich von Teilen der Leber. Dies ist allerdings selten möglich, da das CCC in der Mehrzahl der Fälle erst in einem sehr späten Entwicklungsstadium entdeckt wird (Ahrendt et al. 2001). Die mittlere Überlebenszeit eines Patienten mit unbehandeltem CCC beträgt wenige Monate, wobei das beste Outcome für das R0-resezierte Stadium (kurativer Ansatz) beschrieben ist. Dieses Klientel erreicht im Mittel eine 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 30 % (Tamandl et al. 2009). Jedes andere Therapiekonzept hat einen palliativen Ansatz. Hierzu zählen verschiedene chemotherapeutische Konzepte, bei denen allerdings effektive Regimes noch gefunden werden müssen. Gegenwärtig sind hier die Behandlung mit Gemcitabin, Capecitabin, Cisplatin, Oxaliplatin, Fluoropyrimidin bzw. Kombinationen dieser Therapeutika allgemein akzeptierte Behandlungsschemata (Thongprasert 2005, Khan et al. 2002, Kondo et al. 2008). Auch gibt es Bemühungen hinsichtlich alternativer Therapieoptionen, wie beispielsweise der photodynamischen Therapie, mit der ein verlängertes Überleben von CCC-Patienten erzielt werden konnte (Harewood et al. 2005). Insgesamt ist die Situation beim CCC bezüglich Diagnose und Therapie in keiner Weise zufriedenstellend, so dass vor allem auch neuartige systemische Behandlungskonzepte notwendig sind. Dabei hat sich gezeigt, dass die zielgerichtete Beeinflussung verschiedener Systeme der intrazellulären Signalweiterleitung eine vielversprechende Entwicklungsrichtung sein kann (Beeram und Patnaik 2002, Levitzki und Klein 2010). So wurden beispielsweise jüngst in einer klinischen Phase-I-Studie Daten, die für eine Eignung angiogener Faktoren sowie Her2/neu und MAP-Kinasen als Zielstrukturen bei der Behandlung des CCCs sprechen, erarbeitet (Subbiah et al. 2013). Besonders erwähnenswert ist ein ganz aktueller Trend in der Behandlung epithelialer Tumoren, der die Entwicklung sog. Multitarget-Konzepte betrifft und der auch für das CCC an Bedeutung gewinnt.

6. Diskussion

So scheint es prinzipiell wesentlich erfolgversprechender, mit einer Tumorthherapie nicht nur ein Signalweiterleitungssystem, sondern mehrere gleichzeitig zu beeinflussen. Ein eindrucksvolles Beispiel für ein derartiges systemisches Behandlungsprinzip bietet der Einsatz von Sorafenib, ein sog. Multikinasehemmer, der u. a. verschiedene Proteinkinasen, darunter Raf, VEGFR und PDGFR, inhibieren kann (Wilhelm und Chien 2002) und für dessen klinischen Einsatz, auch für das CCC erste ermutigende Untersuchungsergebnisse vorliegen (El-Khoueiry et al. 2012).

Vor diesem Hintergrund wurde mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an Zellen einer CCC-Primärkultur der international intensiv betriebenen Strategie gefolgt, weitere Effektormoleküle im Tumorzell-Signaling, die möglicherweise auch eine Grundlage für die Entwicklung eines neuen Therapiekonzepts für das CCC bilden können, zu identifizieren. Dabei wurde PAR₂ ausgewählt, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der zelluläre Effekte verschiedener Serinproteinasen vermittelt und von dem die eigene Arbeitsgruppe u. a. zeigen konnte, dass er die Migration von HCC-Zellen über eine Aktivierung des HGF-Rezeptors Met und p42/p44-MAP-Kinasen stimuliert und diese Signalingachse offensichtlich eine Rolle bei der HCC-Progression spielt (Kaufmann et al. 2009). Die Experimente wurden mit Zellen der Primärkultur CCC-787, die aus dem Tumorgewebe eines Patienten mit einem CCC etabliert worden war, durchgeführt. Ein derartiges Primärkultur-Modell bot wesentliche Vorteile gegenüber den ebenfalls in der Tumorforschung häufig verwendeten permanenten Zelllinien, da sich diese im Allgemeinen durch oftmaliges Passagieren in ihren Eigenschaften wesentlich stärker von den ursprünglichen im Tumorgewebe unterscheiden können, als dies bei Zellen einer Primärkultur der Fall ist. Mit Hilfe von RT-PCR gelang an CCC-787-Zellen der Nachweis von PAR₂, so dass damit ein zelluläres CCC-Modell zur Verfügung stand, mit Hilfe dessen Resultate mit hohem Aussagewert zu erwarten waren.

Unter Verwendung eines speziellen Migrationsassays, bei dem die chemotaktische Wanderung von Zellen durch eine poröse, kollagenbeschichte Membranbarriere untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass PAR₂ in CCC-787-Zellen einen migratorischen Effekt vermittelt. Dies wurde geschlussfolgert, da (I) sowohl die Serinproteinase Trypsin als auch der PAR₂-selektive Peptidagonist

6. Diskussion

2-furoyl-LIGRLO-NH₂ die Migration von CCC-787-Zellen signifikant steigerten, (II) der PAR₂-selektive Antagonist P2Pal-18S den migratorischen Effekt von Trypsin und von 2-furoyl-LIGRLO-NH₂ hemmte und (III) das PAR₂-inaktive Kontrollpeptid 2-furoyl-OLRGIL-NH₂ keinen Effekt auf die Migration von CCC-787-Zellen ausübte. Zudem zeigten die Ergebnisse, dass PAR₂ den migratorischen Effekt sowohl nach Aktivierung durch proteolytische Spaltung (Trypsin) als auch ohne einen derartigen enzymatischen Mechanismus, lediglich durch Bindung der für die Aktivierung relevanten Peptidsequenz im Falle des PAR₂-APs, vermittelte. Schließlich scheint die Serinproteinase Trypsin, die prinzipiell auch zur Aktivierung von PAR₁ und PAR₄ in der Lage ist (z. B. Ramachandran et al. 2012), die Migration von CCC-787-Zellen maßgeblich über eine Stimulation von PAR₂ zu vermitteln, da der PAR₂-selektive Antagonist den migratorischen Effekt von Trypsin vollständig hemmte.

Die Migration von Tumorzellen, eine entscheidende Voraussetzung für die Tumorprogression, wird durch zahlreiche intrazelluläre Signalweiterleitungsmechanismen reguliert (Condeelis und Segall 2003, McSherry et al. 2007, Farrow et al. 2008), wobei die Rezeptortyrosinkinase Met im Cholangiokarzinom eine Schlüsselstellung einnimmt (Varnholt et al 2002, Leelawat et al. 2006, Menakongka und Suthiphongchai 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird eine neue Met-assoziierte Signalweiterleitungsachse beschrieben, die eine PAR₂-vermittelte Met-Aktivierung einschließt und die Migration von CCC-787-Zellen stimuliert. Eine derartige Rezeptorinteraktion wurde durch Effekte von Trypsin und des PAR₂-APs auf die Met-Met-Phosphorylierung charakterisiert. Zudem lieferten Daten der pharmakologischen Hemmexperimente, wonach die Met-Inhibitoren SU 11274 und PHA 665752 den PAR₂-vermittelten migratorischen Effekt hemmten, weitere Belege für eine Beteiligung eines PAR₂-Met-Crosstalks am motogenen Signaling von CCC-787-Zellen. Da eine Met-Inhibierung allerdings nicht zu einer vollständigen Blockierung des Effekts von Trypsin sowie des PAR₂-APs auf die Migration von CCC-787-Zellen führte, kann davon ausgegangen werden, dass unabhängig von Met weitere Signalweiterleitungssysteme in das migratorische Signaling von PAR₂ involviert sind (Abbildung 9 zeigt ein auf Basis der Daten der vorliegenden Arbeit entwickeltes Arbeitsmodell der PAR₂-vermittelten migratorischen Signalingsequenz in CCC-787-Zellen).

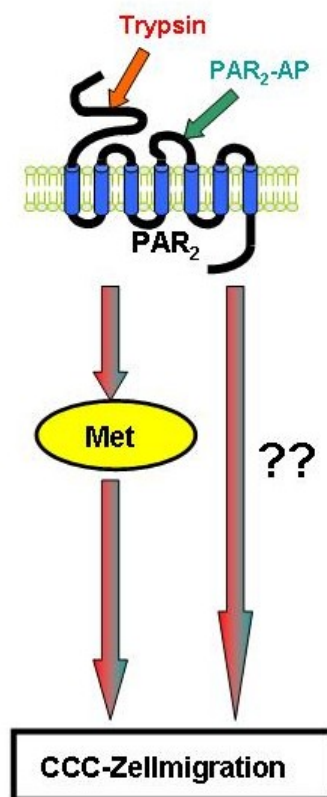


Abb. 9) Arbeitsmodell für die PAR₂-vermittelte migratorische Signalweiterleitung in CCC-787-Zellen

Nach Stimulation von PAR₂ durch Trypsin bzw. das PAR₂-AP 2-furoyl-LIGRLO-NH₂ kommt es zu einer Aktivierung von Met, die in der Folge zu einer Erhöhung der migratorischen Kapazität von CCC-787-Zellen führt. Zusätzlich ist PAR₂ in der Lage, die Migration von CCC-787-Zellen über Met-unabhängiges Signaling zu beeinflussen.

Da in HCC-Zellen kürzlich für PAR₂ ein ähnlicher Mechanismus nachgewiesen wurde, bei dem zusätzliche reaktive Sauerstoffspezies und p42/p44-MAP-Kinasen eine Rolle spielen (Kaufmann et al. 2009), sollte in nachfolgenden Untersuchungen überprüft werden, ob ein derartiges PAR₂-assoziiertes Signaling-Netzwerk auch in CCC-Zellen vorkommt.

7. Schlussfolgerung

(I) Im Rahmen dieser Arbeit wird erstmals eine Funktion von PAR₂ in Cholangiokarzinomzellen beschrieben. Diese betrifft die Vermittlung einer Aktivierung des HGF-Rezeptors Met, die zur Steigerung der Migration von CCC-Zellen führt.

(II) Da ein erhöhtes migratorisches Potenzial von Tumorzellen eine wichtige Voraussetzung für die Progression von Malignomen darstellt, ist eine diesbezügliche Rolle des PAR₂-Met-Signalweges für das CCC zu vermuten. Dies wird auch durch Befunde gestützt, wonach sowohl PAR₂ als auch Trypsin in der CCC-Tumormikroumgebung nachgewiesen werden konnten (Nakanuma et al. 2010, Terada et al. 1995, 1996).

(III) Die bisher erarbeiteten Ergebnisse zur Funktion von PAR₂ in CCC-Zellen liefern gute Voraussetzungen für nachfolgende Untersuchungen, die einmal die weitere Aufklärung des PAR₂-Signaling in CCC-Zellen, möglicherweise auch in anderen Zellarten der CCC-Tumormikroumgebung, betreffen sollten. Zum anderen sind Arbeiten am Versuchstier notwendig, wobei hier ein in der Arbeitsgruppe bereits etabliertes Tumormodell der Maus, bei dem ein Karzinom durch Injektion von Tumorzellen in die Flanke der Tiere induziert wird, auch im Falle des CCC zur Untersuchung der PAR₂ *in vivo* genutzt werden sollte.

(IV) Im Hinblick auf die Entwicklung von Grundlagen für eine neue CCC-Therapie kann aus den Daten der Arbeit perspektivisch abgeleitet werden, dass eine Beeinflussung des PAR₂-Signaling, beispielsweise durch eine kombinierte Hemmung von PAR₂ und Met, ein verfolgenswertes Ziel darstellt.

8. Literaturverzeichnis

Ahrendt SA, Nakeeb A, Pitt HA. 2001.

Cholangiocarcinoma. Clin Liver Dis, 5(1):191-218.

Bale R, Schullian P, Haidu M, Widmann G. 2013.

Stereotaktische Radiofrequenzablation von intrahepatischen cholangiozellulären Karzinomen - eine minimal invasive Alternative zur Leberresektion. Wien Med Wochenschr. DOI: 10.1007/s10354-013-0182-8, online unter <http://link.springer.com/article/10.1007/s10354-013-0182-8>.

Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang, L, Chitale D, Motoi N, Szoke J, Broderick S, Balak M, Chang WC, Yu CJ, Gazdar A, Pass H, Rusch V, Gerald W, Huang SF, Yang PC, Miller V, Ladanyi M, Yang CH, Pao W. 2007.

MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(52):20932-20937.

Beeram M und Patnaik A. 2002.

Targeting intracellular signal transduction A new paradigm for a brave new world of molecularly targeted therapeutics. Hematol Oncol Clin North Am, 16(5):1089-1100.

Belamaric, J. 1973.

Intrahepatic bile duct carcinoma and C. sinensis infection in Hongkong. Cancer, 31(2):468–473.

Bergmann S, Junker K, Henklein P, Hollenberg MD, Settmacher U, Kaufmann R. 2006.

PAR-type thrombin receptors in renal carcinoma cells: PAR1-mediated EGFR activation promotes cell migration. Oncol Rep, 15(4):889-893.

Bertotti A und Comoglio PM. 2003.

Tyrosine kinase signal specificity: lessons from the HGF receptor. Trends Biochem Sci, 28(10):527-533.

8. Literaturverzeichnis

Birchmeier C und Gherardi E. 1998.

Development roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. Trends Cell Biol, 8(10):404-410.

Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. 2003.

Met, metastasis, motility and more. Nat Rev Mol Cell Biol, 4(12):915-925.

Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. 1995.

Essential role for the c-*met* receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. Nature 376(6543):768-771.

Bloom CM, Langer B, Wilson SR. 1999.

Role of US in the Detection, Characterization, and Staging of Cholangiocarcinoma. Radiographics, 19(5):1199-1218.

Böhm SK, Khitin LM, Grady EF, Aponte G, Payan DG, Bunnett NW. 1996.

Mechanisms of Desensitization and Resensitization of Proteinase-activated Receptor-2. J Biol Chem, 271(36):22003-22016.

Böhm SK, Grady EF, Bunnett NW. 1997.

Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. Biochem J, 322(Pt 1):1-18.

Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. 1991.

Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. Science, 251(4995):802-804.

Buckminster F, Albo D, Berger DH. 2008.

The Role of the Tumor Microenvironment in the Progression of Pancreatic Cancer. J Surg Res, 149(2):319-328.

Caruso R, Pallone F, Fina D, Gioia V, Peluso I, Caprioli F, Stolfi C, Perfetti A, Spagnoli LG, Palmieri G, MacDonald TT, Monteleone G. 2006.

Protease-Activated Receptor-2 Activation in Gastric Cancer Cells Promotes Epidermal Growth Factor Receptor *Trans*-Activation and Proliferation. Am J Pathol, 169(1):268-278.

8. Literaturverzeichnis

Caterina MJ und Devreotes PN. 1991.

Molecular insights into eukaryotic chemotaxis. FASEB J, 5(15):3078-3085.

Chen CH, Paing MM, Trejo J. 2004.

Termination of protease-activated receptor-1 signaling by beta-arrestins is independent of receptor phosphorylation. J Biol Chem, 279(11):10020-10031.

Cheung W, Andrade-Gordon P, Derian CK, Damiano BP. 1998.

Mechanisms of action of proteinase-activated receptor agonists on human platelets. Br J Pharmacol, 135(5):1123-1132.

Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S, Wehland J, Birchmeier C, Birchmeier W. 2007.

c Met is essential for wound healing in the skin. J. Cell Biol, 177(1):151-162.

Chow JM, Moffatt JD, Cocks TM. 2000.

Effect of protease-activated receptor (PAR)-1, -2 and -4-activating peptides, thrombin and trypsin in rat isolated airways. Br J Pharmacol, 131(8):1584-1591.

Christensen JG, Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan E, Le P, Chen J, Wang X, Ruslim L, Blake R, Lipson KE, Ramphal J, Do S, Cui JJ, Cherrington JM, Mendel DB. 2003.

A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumor activity in vivo. Cancer Res, 63(21):7345-7355.

Cicala C, Morello S, Santagada V, Caliendo G, Sorrentino L, Cirino G. 2001.

Pharmacological dissection of vascular effects caused by activation of protease-activated receptor 1 and 2 in anesthetized rats. FASEB J, 15(8):1433-1435.

Clapham DE und Neer EJ. 1993.

New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. Nature, 365(6445):403-406.

Clapham DE und Neer EJ. 1997.

G protein beta gamma subunits. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 37:167-203.

8. Literaturverzeichnis

Cocks TM und Moffatt JD. 2000.

Protease-activated receptors: sentries for inflammation? Trends Pharmacol Sci, 21(3):103-108.

Comoglio PM und Trusolino L. 2002.

Series Introduction: Invasive growth: from development to metastasis. J Clin Invest, 109(7):857-862.

Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. 2008.

Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. Nat Rev Drug Discov, 7(6):504-516.

Condeelis J und Segall JE. 2003.

Intravital imaging of cell movement in tumours. Nat Rev Cancer, 3(12):921-930.

Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, Vande Woude CF. 1984.

Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. Nature, 311(5981):29-33.

Corso S, Comoglio PM, Giordano S. 2005.

Cancer therapy: can the challenge be MET?. Trends Mol Med, 11(6):284-292.

Cotecchia S, Ostrowski J, Kjelsberg MA, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1992.

Discrete amino acid sequences of the alpha 1-adrenergic receptor determine the selectivity of coupling to phosphatidylinositol hydrolysis. J Biol Chem, 267(3):1633-1639.

Cottrell GS, Amadesi S, Schmidlin F, Bunnett N. 2003.

Protease-activated receptor 2: activation, signalling and function. Biochem Soc Trans, 31(Pt 6):1191–1197.

Courbiere M, Pilleul F, Henry L, Ponchon T, Touzet S, Valette PJ. 2003.

Value of magnetic resonance cholangiography in benign and malignant biliary stenosis: comparative study with direct cholangiography. J Comput Assist Tomogr, 27(3):315-320.

8. Literaturverzeichnis

Darmoul D, Marie JC, Devaud H, Gratio V, Laburthe M. 2001.

Initiation of human colon cancer cell proliferation by trypsin acting at protease-activated receptor-2. Br J Cancer, 85(5):772-779.

Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, Laburthe M. 2003.

Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. Am J Pathol, 162(5):1503-1513.

Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Peiretti F, Laburthe M. 2004a.

Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation. Mol Cancer Res, 2(9):514-522.

Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Laburthe M. 2004b.

Protease-activated receptor 2 in colon cancer: trypsin-induced MAPK phosphorylation and cell proliferation are mediated by epidermal growth factor receptor transactivation. J Biol Chem, 279(20):20927-20934.

Daub H, Weiss U, Wallasch C, Ullrich A. 1996.

Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. Nature, 379(6565):557-560.

D'Andrea MR, Derian CK, Leturcq D, Baker SM, Brunmark A, Ling P, Darrow AL, Santulli RJ, Brass LF, Andrade-Gordon P. 1998.

Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues. J Histochem Cytochem 46(2):157-164.

D'Andrea MR, Derian CK, Santulli RJ, Andrade-Gordon P. 2001.

Differential expression of protease-activated receptors-1 and -2 in stromal fibroblasts of normal, benign, and malignant human tissues. Am J Pathol, 158(6):2031-2041.

DeFea K. 2008.

β -arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal transduction. Br J Pharmacol, 153(Suppl 1):298-309.

8. Literaturverzeichnis

Derian CK, Eckardt AJ, Andrade-Gordon P. 1997.

Differential regulation of human keratinocyte growth and differentiation by a novel family of protease-activated receptors. *Cell Growth Differ*, 8(7):743-749.

Déry O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW. 1998.

Receptor activating peptides distinguish thrombin receptor (PAR1) and protease activated receptor 2 (PAR-2) mediated hemodynamic responses in vivo. *Can J Physiol Pharmacol*, 76(1):16-25.

Déry O, Thoma MS, Wong H, Grady EF, Bunnett NW. 1999.

Trafficking of Proteinase-activated Receptor-2 and β -Arrestin-1 Tagged with Green Fluorescent Protein. β -Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor. *J Biol Chem*, 274(26):18524-18535.

Duh FM, Scherer SW, Tsui LC, Lerman MI, Zbar B, Schmidt L. 1997.

Gene structure of the human MET proto-oncogene. *Oncogene*, 15(13):1583-1586.

El-Khoueiry A, Rankin C, Ben-Josef E, Lenz HJ, Gold P, Hamilton R, Govindarajan R, Eng C, Blanke C. 2012.

SWOG 0514: a phase II study of sorafenib in patients with unresectable or metastatic gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma. *Invest New Drugs*, 30(4):1646-1651.

Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA. 2007.

MET Amplification Leads to Gefitinib Resistance in Lung Cancer by Activating ERBB3 Signaling. *Science*, 316(5827):1039-1043.

Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. 2000.

Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene*, 19(49):5582-5589.

Gandino L, Longati P, Medico E, Prat M, Comoglio PM. 1994.

Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *J Biol Chem*, 269(3):1815-1820.

8. Literaturverzeichnis

Ge L, Shenoy SK, Lefkowitz RJ, DeFea K. 2004.

Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. J Biol Chem, 279(53):55419-55424.

Gentile A, Trusolino L, Comoglio PM. 2008.

The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. Cancer Metast Rev, 27(1):85-94.

Gether U und Kobilka BK. 1998.

G Protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. J Biol Chem, 273(29):17979-17982.

Grab DJ, Garcia-Garcia JC, Nikolskaia OV, Kim YV, Brown A, Pardo CA, Zhang Y, Becker KG, Wilson BA, Lima APCA, Scharfstein J, Dumler JS. 2009.

Protease Activated Receptor Signaling Is Required for African Trypanosome Traversal of Human Brain Microvascular Endothelial Cells. PLoS Negl Trop Dis, 3(7):e479.

Green BT, Bunnett NW, Kulkarni-Narla A, Steinhoff M, Brown DR. 2000.

Intestinal type 2 proteinase-activated receptors: expression in opioid-sensitive secretomotor neural circuits that mediate epithelial ion transport. J Pharmacol Exp Ther, 295(1):410–416.

de Haën C. 1976.

The non-stoichiometric floating receptor model for hormone sensitive adenylyl cyclase. J Theor Biol, 58(2):383-400.

Hann LE, Getrajdman GI, Brown KT, Bach AM, Teitcher JB, Fong Y, Blumgart LH. 1996.

Hepatic lobar atrophy: association with ipsilateral portal vein obstruction. AJR Am J Roentgenol, 167(4):1017-1021.

Hann LE, Gatrex KV, Bach AM, Fong Y, Blumgart LH. 1997.

Cholangiocarcinoma at the hepatic hilus: sonographic findings. AJR Am J Roentgenol, 168(4):985-989.

8. Literaturverzeichnis

Hara T, Ooi A, Kobayashi M, Mai M, Yanagihara K, Nakanishi I. 1998.

Amplification of c-myc, K-sam, and c-met in gastric cancers: detection by fluorescence in situ hybridization. Lab Invest, 78(9):1143-1153.

Harder J, Riecken B, Kummer O, Lohrmann C, Otto F, Usadel H, Geissler M, Opitz O, Henß H. 2006.

Outpatient chemotherapy with gemcitabine and oxaliplatin in patients with biliary tract cancer. Br J Cancer, 95(7):848-852.

Harder J, Grotelüschen R, Kim JS, Iszbicki J. 2009.

Das cholangiozelluläre Karzinom aus der Sicht des Internisten und des Chirurgen. Gastroenterologe, 4(4):312-321.

Harewood GC, Baron TH, Rumalla A, Wang KK, Gores GJ, Stadheim LM, de Groen PC. 2005.

Pilot study to assess patient outcomes following endoscopic application of photodynamic therapy for advanced cholangiocarcinoma. J Gastroen Hepatol, 20(3):415-420.

Hasdemir B, Bunnett NW, Cottrell GS. 2007.

Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS) mediates post-endocytic trafficking of protease-activated receptor 2 and calcitonin receptor-like receptor. J Biol Chem, 282(40):29646-29657.

Hasdemir B, Murphy JE, Cottrell GS, Bunnett NW. 2009.

Endosomal Deubiquitinating Enzymes Control Ubiquitination and Down-regulation of Protease-activated Receptor 2. J Biol Chem, 284(41):28453-28466.

Hein L, Ishii K, Coughlin SR, Kobilka BK. 1994.

Intracellular targeting and trafficking of thrombin receptors. A novel mechanism for resensitization of a G protein-coupled receptor. J Biol Chem, 269(44):27719-27726.

Hintze RE, Abou-Rebyeh H, Adler A, Veltzke-Schlieker W, Felix R, Wiedenmann B. 2001.

Magnetic resonance cholangiopancreatography-guided unilateral endoscopic stent placement for Klatskin tumors. Gastrointest Endosc, 53(1):40-46.

8. Literaturverzeichnis

Hjortoe GM, Petersen LC, Albrechtsen T, Sorensen BB, Norby PL, Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LV. 2004.

Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. Blood, 103(8):3029-3037.

Hollenberg MD und Compton SJ. 2002.

International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. Pharmacol Rev, 54(2):203-217.

Houldsworth J, Cordon-Cardo C, Ladanyi M, Kelsen DP, Chaganti RS. 1990.

Gene amplification in gastric and esophageal adenocarcinomas. Cancer Res, 50(19):6417-6422.

Huh CG, Factor VM, Sánchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. 2004.

Hepatocyte growth factor/*c-met* signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(13):4477-4482.

Ikeda O, Egami H, Ishiko T, Ishikawa S, Kamohara H, Hidaka H, Mita S, Ogawa M. 2003.

Expression of proteinase-activated receptor-2 in human pancreatic cancer: A possible relation to cancer invasion and induction of fibrosis. Int J Oncol, 22(2):295-300.

Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR. 1997.

Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. Nature, 386(6624):502-506.

Jacobs S und Cuatrecasas P. 1976.

The mobile receptor hypothesis and "cooperativity" of hormone binding. Application to insulin. Biochim Biophys Acta, 433(3):482-495.

8. Literaturverzeichnis

Jang JY, Kim SW, Park DJ, Ahn YJ, Yoon YS, Choi GC, Suh KS, Lee KU, Park YH. 2005.

Actual Long-term Outcome of Extrahepatic Bile Duct Cancer After Surgical Resection. *Ann Surg*, 241(1):77-84.

Jarry A Dorso L, Gratio V, Forgue-Lafitte M, Laburthe M, Laboisie C, Darmoul D. 2007.

PAR-2 activation increases human intestinal mucin secretion through EGFR transactivation. *Biochem Biophys Res Commun*, 364(3):689-694.

Jeffers M, Rong S, Vande Woude GF. 1996.

Hepatocyte growth factor scatter factor-Met signalling in tumorigenicity and invasion/metastasis. *J Mol Med*, 74(9):505-513.

Jikuhara A, Yoshii M, Iwagaki H, Mori S, Nishibori M, Tanaka N. 2003.

MAP kinase-mediated proliferation of DLD-1 carcinoma by the stimulation of protease-activated receptor 2. *Life Sci*, 73(22):2817-2829.

Kaczynski J, Hansson G, Wallerstedt S. (1996)

Incidence of primary liver cancer and aetiological aspects: a study of a defined population from a low-endemicity area. *Br J Cancer*, 73(1):128–132.

Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV Jr, Tam C, Coughlin SR. 1998a.

A dual Thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, 394(6694):690-694.

Kahn ML, Hammes SR, Botka C, Coughlin SR. 1998b.

Gene and locus structure and chromosomal localization of the protease-activated receptor gene family. *J Biol Chem*, 273(36):23290-23296.

Kahn SA, Davidson BR, Goldin R, Pereira SP, Rosenberg WMC, Tayler-Robinson SD, Thillainayagam AV, Thomas HC, Thursz MR, Wasan H. 2002.

Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. *Gut*, 51(Suppl 6):VI1-VI9.

8. Literaturverzeichnis

Kaufmann R, Schafberg H, Nowak G. 1998.

Proteinase-activated receptor-2-mediated signaling and inhibition of DNA synthesis in human pancreatic cancer cells. *Int J Pancreatol*, 24(2):97-102.

Kaufmann R, Rahn S, Pollrich K, Hertel J, Dittmar Y, Hommann M, Henklein P, Biskup C, Westermann M, Hollenberg MD, Settmacher U. 2007.

Thrombin-mediated hepatocellular carcinoma cell migration: Cooperative action via proteinase-activated receptors 1 and 4. *J Cell Physiol*, 211(3):699-707.

Kaufmann R, Oettel C, Horn A, Halbhuber KJ, Eitner A, Krieg R, Katenkamp K, Henklein P, Westermann M, Böhmer FD, Ramachandran R, Saifeddine M, Hollenberg MD, Settmacher U. 2009.

Met receptor tyrosine kinase transactivation is involved in proteinase-activated receptor-2-mediated hepatocellular carcinoma cell invasion. *Carcinogenesis*, 30(9):1487-1496.

Kawao N, Nagataki M, Nagasawa K, Kubo S, Cushing K, Wada T, Sekiguchi F, Ichida S, Hollenberg MD, MacNaughton WK, Nishikawa H, Kawabata A. 2005.

Signal Transduction for Proteinase-Activated Receptor-2-Triggered Prostaglandin E₂ Formation in Human Lung Epithelial Cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 315(2):576-589.

Kawarada Y und Mizumoto R. 1984.

Cholangiocellular carcinoma of the liver. *Am J Surg*, 147(3):354-359.

Kenakin T und Miller LJ. 2010.

Seven Transmembrane Receptors as Shapeshifting Proteins: The Impact of Allosteric Modulation and Functional Selectivity on New Drug Discovery. *Pharmacol Rev*, 62(2):265-304.

Kondo S, Takada T, Miyazaki M, Miyakawa S, Tsukada K, Nagino M, Furuse J, Saito H, Tsuyuguchi T, Yamamoto M, Kayahara M, Kimura F, Yoshitomi H, Nozawa S, Yoshida M, Wada K, Hirano S, Amano H, Miura F. 2008.

Guidelines for the management of biliary tract and ampullary carcinomas: surgical treatment. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 15(1):41-54.

8. Literaturverzeichnis

Kong W, McConalogue K, Khitin LM, Hollenberg MD, Payan DG, Bohm SK, Bunnett NW. 1997.

Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2. Proc Natl Acad Sci U S A, 94(16):8884-8889.

Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H, Tahara E. 1992.

Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer. Biochem Biophys Res Commun, 189(1):227-232.

Lan RS, Knight DA, Stewart GA, Henry PJ 2001.

Role of PGE(2) in protease-activated receptor-1, -2 and -4 mediated relaxation in the mouse isolated trachea. Br J Pharmacol, 132(1):93–100.

Lee TY, Lin JT, Kuo KN, Wu MS, Ho HJ, Chen TT, Wu CY. 2012.

A nationwide population-based study shows increasing incidence of cholangiocarcinoma. Hepatol Int, 6(5):1-7.

Leelawat K, Leelawat S, Tepaksorn P, Rattanasinganchan P, Leungchaweng A, Tohtong R, Sobhon P. 2006.

Involvement of c-Met/hepatocyte growth factor pathway in cholangiocarcinoma cell invasion and its therapeutic inhibition with small interfering RNA specific for c-Met. J Surg Res, 136(1):78-84.

Levitzki A und Klein S. 2010.

Signal transduction therapy of cancer. Mol Aspects Med, 31(4):287-329.

Li W, Nakagawa T, Koyama N, Wang X, Jin J, Mizuno-Horikawa Y, Gu J, Miyoshi E, Kato I, Honke K, Taniguchi N, Kondo A. 2006.

Down-regulation of trypsinogen expression is associated with growth retardation in alpha1,6-fucosyltransferase-deficient mice: attenuation of proteinase-activated receptor 2 activity. Glycobiology, 16(10):1007-1019.

Liquory C und Canard JM. 1983.

Tumours of the biliary system. Clin Gastroenterol, 12(1):269-295.

8. Literaturverzeichnis

Lindner JR, Kahn ML, Coughlin SR, Samrano GR, Schauble E, Bernstein D, Foy D, Hafezi-Moghadam A, Ley K. 2000.

Delayed Onset of Inflammation in Protease-Activated Receptor-2-Deficient Mice. J Immunol, 165(11):6504-6510.

Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM. 1994.

Tyrosines are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). Oncogene, 9(1):49-57.

Lourbakos A, Yuan YP, Jenkins AL, Travis J, Andrade-Gordon P, Santulli R, Potempa J, Pike RN. 2001.

Activation of protease-activated receptors by gingipains from Porphyromonas gingivalis leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. Blood, 97(12):3790-3797.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951.

Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 193(1):265-275.

Luo W, Wang Y, Reiser G. 2007.

Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. Brain Res Rev, 56(2):331–345.

Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. 2001.

Proteinase-activated receptors. Pharmacol Rev, 53(2):245-282.

Machide M, Hashigasako A, Matsumoto K, Nakamura T. 2006.

Contact inhibition of hepatocyte growth regulated by functional association of the c-Met/hepatocyte growth factor receptor and LAR protein-tyrosine phosphatase. J Biol Chem, 281(13):8765-8772.

Matteucci E, Ridofi E, Desiderio MA. 2006.

Hepatocyte growth factor differently influences Met-E-cadherin phosphorylation and downstream signaling pathway in two models of breast cells. Cell Mol Life Sci, 63(17):2016-2026.

8. Literaturverzeichnis

Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, Ma PC, Morrison PT, Salgia R. 2002.

Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. Cytokine Growth Factor Rev, 13(1):41-59.

McSherry EA, Donatello S, Hopkins AM, McDonnell S. 2007.

Molecular basis of invasion in breast cancer. Cell Mol Life Sci, 64(24):3201-3218.

Menakongka A und Suthiphongchai T. 2010.

Involvement of PI3K and ERK1/2 pathways in hepatocyte growth factor-induced cholangiocarcinoma cell invasion. World J Gastroenterol, 16(6):713-722.

Miller CT, Casper AM, Lim J, Thomas DG, Orringer MB, Chang AC, Chambers AF, Giodrano TJ, Glover TW, Beer DG. 2006.

Genomic amplification of MET with boundaries within fragile site FRA7G and upregulation of MET pathways in esophageal adenocarcinoma. Oncogene, 25(3):409-418

Milligan G und Kostenis E. 2006.

Heterotrimeric G-proteins: a short history. Br J Pharmacol, 147(1):46-55.

Moffatt JD, Jeffrey KL, Cocks TM. 2002.

Protease-activated receptor-2 activating peptide SLIGRL inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced recruitment of polymorphonuclear leukocytes into the airways of mice. Am J Respir Cell Mol Biol, 26:680–684.

Morris AJ und Malbon CC. 1999.

Physiological regulation of G protein-linked signaling. Physiol Rev, 79(4):1373-1430.

Morris DR, Ding Y, Ricks TK, Gullapalli A, Wolfe BL, Trejo J. 2006.

Protease-Activated Receptor-2 Is Essential for Factor VIIa and Xa-Induced Signaling, Migration, and Invasion of Breast Cancer Cells. Cancer Res, 66(1):307-314.

Moto R und Kwarada Y (Autoren). 1986.

Diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma and cystic adenocarcinoma of the liver (Titel des Kapitels). In: Okuda K, Ishak KG (Herausgeber). Neoplasms of the Liver (Titel des Buchs). Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 381-396.

8. Literaturverzeichnis

Nagino M, Kamiya J, Kanai M, Uesaka, K, Hayakawa N, Yamamoto H, Kondo S, Nishio H. 1998.

Segmental liver resections for hilar cholangiocarcinoma. Hepatogastroenterol, 45(19):7-13.

Nakeeb A, Pitt HA, Sohn TA, Coleman J, Abrams RA, Piantadosi S, Hruban RH, Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL. 1996.

Cholangiocarcinoma. A spectrum of intrahepatic, perihilar and distal tumors. Ann Surg, 224(4):463-473.

Nakajima T, Kondo Y, Miyazaki M, Okui K. 1988.

A histopathologic study of 102 cases of intrahepatic cholangiocarcinoma: Histologic classification and modes of spreading. Hum Pathol, 12(10):1228-1234.

Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Tashiro K, Shimizu S. 1989.

Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. Nature, 324(6248):440-443.

Nakanuma S, Tajima H, Okamoto K, Hayashi H, Nakagawara H, Onishi I, Takamura H, Kitagawa H, Fushida S, Tani T, Fujimura T, Kayahara M, Ohta T, Wakayama T, Iseki S, Harada S. 2010.

Tumor-derived trypsin enhances proliferation of intrahepatic cholangiocarcinoma cells by activating protease-activated receptor-2. Int J Oncol, 36(4):793-800.

Naldini L, Vigna E, Ferracini R, Longati P, Gandino L, Prat M, Comoglio PM. 1991a.

The tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene is activated by autophosphorylation. Mol Cell Biol, 11(4):1793-1803.

Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Barelli A, Ponzetto C, Narsimhan R, Hartmann G, Zarnegar R, Michaelopoulos K, Birchmeier W, Comoglio PM. 1991b.

Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the *MET* receptor. EMBO J, 10(10):2867-2878.

8. Literaturverzeichnis

Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM. 1991c.

Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene*, 6(4):501-504.

Nehls O, Oettle H, Hartmann JT, Hofheinz RD, Hass HG, Horger MS, Koppenhöfer U, Hochhaus A, Stieler J, Trojan J, Gregor M, Klump B. 2008.

Capecitabine plus oxaliplatin as first-line treatment in patients with advanced biliary system adenocarcinoma: a prospective multicentre phase II trial. *Br J Cancer*, 98(2): 309-315.

Neves SR, Ram PT, Iyengar R. 2002.

G protein pathways. *Science*, 296(5573):1636-1639.

Nickel TJ, Kabir MH, Talreja J, Stechschulte DJ, Dileepan KN. 2006.

Constitutive expression of functionally active protease-activated receptors 1 and 2 in human conjunctival epithelial cells. *Mediators Inflamm*, 2006(3):61359.

Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. 1994.

Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(20):9208–9212.

Nystedt S, Emilsson K, Larsson AK, Strömbeck B, Sundelin J. 1995.

Molecular Cloning and Functional Expression of the Gene Encoding the Human Proteinase-Activated Receptor 2. *Eur J Biochem*, 232(1):84-89.

Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G. 1994.

G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(2):504-508.

Okuda K, Kubo Y, Okazaki N, Arishima T, Hashimoto M, Jinnouchi S, Sawa Y, Shimokawa Y, Nakajima Y, Noguchi T, Nakano M, Kojiro M, Nakashima T. 1977.

Clinical aspects of intrahepatic bile duct carcinoma including hilar carcinoma. A study of 57 autopsy-proven cases. *Cancer*, 39(1):232-246.

8. Literaturverzeichnis

Olivero M, Valente G, Bardelli A, Longati P, Ferrero N, Cracco C, Terrone C, Rocca-Rossetti S, Comoglio PM, Di Renzo MF. 1999.

Novel mutation in the ATP-binding site of the MET oncogene tyrosine kinase in a HPRCC family. Int J Cancer, 82(5):640-643.

Organ SL und Tsao MS. 2011.

An overview of the c-MET signaling pathway. Ther Adv Med Oncol, 3(1):7-19.

Ossovskaya VS und Bunnett NW. 2004.

Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. Physiol Rev 84(2):579-621.

Palka HL, Park M, Tonks NK. 2003.

Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1. J Biol Chem, 278(8):5728-5735.

Patel AH, Harnois DM, Klee GG, LaRusso NF, Gores GJ. 2000.

The utility of CA 19-9 in the diagnoses of cholangiocarcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis. Am J Gastroenterol, 95(1):204-207.

Peruzzi B und Bottaro DP. 2006.

Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. Clin Cancer Res, 12(12):3657-3660.

Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, Naujokas MA, Band H, Langdon WY, Park M. 2001.

Mutation of the c-Cbl TKB Domain Binding Site on the Met Receptor Tyrosine Kinase Converts It into a Transforming Protein. Mol Cell, 8(5):995-1004.

Peterson GL. 1979.

Review of the Folin phenol protein quantitation of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. Anal Biochem, 100(2):201-220.

Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayoyou, G, Comoglio PM. 1994.

A multifunctional docking site mediates signalling and transformation by the HGF/SF receptor family. Cell, 77(2):261-271.

8. Literaturverzeichnis

Prat M, Narsimhan RP, Crepaldi T, Nicotra MR, Natali PG, Comoglio PM. 1991.

The receptor encoded by the human C-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors. Int J Cancer, 49(3):323-328.

Ramachandran R und Hollenberg MD. 2007.

Proteinases and signalling: pathophysio-logical and therapeutic implications via PARs and more. Br J Pharmacol, 153(Suppl 1):263-282.

Ramachandran R, Mihara K, Mathur M, Rochdi MD, Bouvier M, DeFea K, Hollenberg MD. 2009.

Agonist-Biased Signaling via Proteinase Activated Receptor-2: Differential Activation of Calcium and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. Mol Pharmacol, 76(4): 791-801.

Ramachandran R, Nourbakhsh F, Defea K, Hollenberg MD. 2012.

Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. Nat Rev Drug Discov, 11(1):69-86.

Ramirez R, Hsu D, Patel A, Fenton C, Dinauer C, Tuttle RM, Francis GL. 2000.

Over-expression of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and the HGF/SF receptor (cMET) are associated with a high risk of metastasis and recurrence for children and young adults with paillary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol, 53(5):635-644.

Raney Jr. RB, Hays DM, Lawrence Jr. W, Soule EH, Tefft M, Donaldson MH. 1978.

Paratesticular rhabdomyosarcoma in childhood. Cancer, 42(2):729-736.

Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, Schlesinger Y, Pagès G, Pavirani A, Lecocq JP, Pouyssegur J, Van Obberghen-Schilling E. 1991.

cDNA cloning and expression of a hamster α -thrombin receptor coupled to Ca^{2+} mobilization. FEBS Lett, 288(1-2):123-128.

Rattenholl A, Seeliger S, Buddenkotte J, Schön M, Schön MP, Ständer S, Vergnolle N, Steinhoff M. 2007.

Proteinase-activated receptor-2 (PAR2): a tumor suppressor in skin carcinogenesis. J Invest Dermatol, 127(9):2245-2252.

8. Literaturverzeichnis

Ricciardolo FL, Steinhoff M, Amadesi S, Guerrini R, Tognetto M, Trevisani M, Creminon C, Bertrand C, Bunnett NW, Fabbri LM, Salvadori S, Geppetti P. 2000.

Presence and bronchomotor activity of protease-activated receptor-2 in guinea pig airways. Am J Respir Crit Care Med, 161(5):1672–1680.

Ricks TK und Trejo J. 2009.

Phosphorylation of Protease-activated Receptor-2 Differentially Regulates Desensitization and Internalization. J Biol Chem, 284(49):34444-34457.

Robert Koch-Institut. 2010.

Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends (2010), online unter http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/re2vZ21t28lr8Y/PDF/22aJOdYnmXV0I.pdf.

Robin J, Kharbanda R, Mclean P, Campbell R, and Vallance P. 2003.

Protease-activated receptor 2-mediated vasodilatation in humans in vivo: role of nitric oxide and prostanoids. Circulation, 107(7):954-959.

Rodrigues GA und Park M. 1994.

Autophosphorylation modulates the kinase activity and oncogenic potential of the Met receptor tyrosine kinase. Oncogene, 9(7):2019-2027.

Rong S, Bodescot M, Blair D, Dunn J, Nakamura T, Mizuno K, Park M, Chan A, Aaronson S, Vande Woude GF. 1992.

Tumorigenicity of the met proto-oncogene and the gene for hepatocyte growth factor. Moll Cell Biol, 12(11):5152-5158.

Roosterman D, Schmidlin F, Bunnett NW. 2003.

Rab5a and rab11 a mediate agonist-induced trafficking of protease-activated receptor 2. Am J Physiol Cell Physiol, 284(5):1319-1329.

Rösch T, Meining A, Frühmorgen S, Zillinger C, Schusdziarra V, Hellerhoff K. 2002.

A prospective comparison of the diagnostic accuracy of ERCP, MRCP, CT, and EUS in biliary strictures. Gastrointest Endosc, 55(7):870-876.

8. Literaturverzeichnis

Roy S, Saiffedine M, Loutzenisher R, Trigg CR, Hollenberg MD. 1998.

Dual endothelium-dependent vascular activities of proteinase-activated receptor-2-activating peptides: evidence for receptor heterogeneity. Br J Pharmacol, 123(7):1434-1440.

Rubin JS, Bottaro DP, Aaronson SA. 1993.

Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-met proto-oncogene product. Biochim Biophys Acta, 1155(3):357-371.

Sangwan V, Paliouras GN, Abella JV, Dube N, Monast A, Tremblay ML, Park M. 2008.

Regulation of the Met receptor tyrosine kinase by the protein tyrosine phosphatases PTPB and TCPTP. J Biol Chem, 283(49):34374-34383.

Santulli RJ, Derian CK, Darrow AL, Tomko KA, Eckardt AJ, Seiberg M, Scarborough RM, Andrade-Gordon P. 1995.

Evidence for the presence of a protease-activated receptor distinct from the thrombin receptor in human keratinocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, 92(20):9151-9155.

Sattler M, Pride YB, Ma P, Gramlich JL, Chu SC, Quinnan LA, Shirazian S, Liang C, Podar K, Christensen JG, Salgia R. 2003.

A Novel Small Molecule Met Inhibitor Induces Apoptosis in Cells Transformed by the Oncogenic TPR-MET Tyrosine Kinase. Cancer Res, 63(17):5462-5469.

Schaffner F und Ruf W. 2009.

Tissue Factor and PAR2 Signaling in the Tumor Microenvironment. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 29(12):1999-2004.

Schmidlin F, Amadesi S, Dabbagh K, Lewis DE, Knott P, Bunnett NW, Gater PR, Geppetti P, Bertrand C, Stevens ME. 2002.

Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the air-way. J Immunol, 169(9):5315-5321.

Schmidt CM, McKillop IH, Cahill PA, Sitzmann JV. 1997.

Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 236(1):54-58.

8. Literaturverzeichnis

Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, Kinjerski T, Weirich G, Miller M, Lubensky I, Neumann HP, Brauch H, Decker J, Vocke C, Brown JA, Jenkins R, Richard S, Bergerheim U, Gerrard B, Dean M, Linehan WM, Zbar B. 1999.

Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene*, 18(14):2343-2450.

Seatter MJ, Drummond R, Kanke T, Macfarlane SR, Hollenberg MD, Plevin R. 2004. The role of the C-terminal tail in protease-activated receptor-2-mediated Ca^{2+} signalling, proline-rich tyrosine kinase-2 activation, and mitogen-activated protein kinase activity. *Cell Signal*, 16(1):21-29.

Sevigny LM, Zhang P, Bohm A, Lazarides K, Perides G, Covic L, Kuliopulos A. 2011.

Interdicting protease-activated receptor-2-driven inflammation with cell-penetrating pepducins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(20):8491-8496.

Shapiro MJ, Weiss EJ, Faruqi TR, Coughlin SR. 2000.

Protease-activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin. *J Biol Chem*, 275(33):25216-25221.

Shi X, Gangadharan B, Brass LF, Ruf W, Mueller BM. 2004.

Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res*, 2(7):395-402.

Shimamoto R, Sawada T, Uchima Y, Inoue M, Kimura K, Yamashita Y, Yamada N, Nishihara T, Ohira M, Hirakawa K. 2004.

A role for protease-activated receptor-2 in pancreatic cancer cell proliferation. *Int J Oncol*, 24(6):1401-1406.

Sia D, Tovar V, Moeini A, Llovet JM. 2013.

Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies. *Oncogene*. DOI: 10.1038/onc.2012.617. [Epub ahead of print], online unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23318457>.

8. Literaturverzeichnis

Siegbahn A, Johnell M, Nordin A, Aberg M, Velling T. 2008.

TF/VIIa transactivate PDGFRbeta to regulate PDGF-BB-induced chemotaxis in different cell types: involvement of Src and PLC. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(1):135-141.

Singh P und Patel T. 2006.

Advances in the diagnosis, evaluation and management of cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroen*, 22(3):294-299.

Siqueira E, Schoen RE, Silverman W, Martin J, Rabinovitz M, Weissfeld JL, Abu-Elmaagd K, Madariaga JR, Slivka A. 2002.

Detecting cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gastrointest Endosc*, 56(1):40-47.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. 2009.

UICC: TNM classification of malignant tumors. 7te Auflage. Oxford: Wiley-Blackwell.

Statistisches Bundesamt. (2010)

Jeder Vierte starb 2010 an Krebs. (2012) Pressemitteilung Nr. 041 vom 3.2.2012, online unter https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2012/02/PD12_041_232.html.

Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, Hollenberg MD, Wallace JL, Caughey GH, Mitchell SE, Williams LM, Geppetti P, Mayer EA, Bunnett NW. 2000.

Agonists of proteinase activated receptor-2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med*, 6(2):151-158.

Steinhoff M, Boddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, Hollenberg MD. 2005.

Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling on inflammation and immune response. *Endocr Rev*, 26(1):1-43.

Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. 1987.

Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature*, 327(6119):239-242.

8. Literaturverzeichnis

Subbiah IM, Subbiah V, Tsimberidou AM, Naing A, Kaseb aO, Javle M, Fu S, Hong DS, Piha-Paul S, Wheler JJ, Hess KR, Janku F, Falchook GS, Wolff RA, Kurzrock R. 2013.

Targeted therapy of advanced gallbladder cancer and cholangiocarcinoma with aggressive biology: eliciting early response signals from phase 1 trials. *Oncotarget*, 4(1):156-165.

Tamandl D, Grünberger T, Kaczirek K, Kölblinger C, Püspök A, Scheithauer W, Schmid R, Wrba F, Jakesz R. 2009.

Management des Cholangiokarzinoms. *J Gastroenterol Hepatol Erkr*, 7(1):34-50.

Terada T, Okada Y, Nakanuma Y. 1995.

Expression of matrix proteinases during human intrahepatic bile duct development. A possible role in biliary cell migration. *Am J Pathol*, 147(5):1207-1213.

Terada T, Okada Y, Nakanuma Y. 1996.

Expression of immunoreactive matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human normal livers and primary liver tumors. *Hepatology*, 23(6):1341-1344.

Thongprasert S. 2005.

Role of chemotherapy in cholangiocarcinoma. *Ann Oncol*, 16(2):93-96.

Tillich M, Mischinger HJ, Preisegger KH, Rabl H, Szolar DH. 1998.

Multiphasic helical CT in diagnosis and staging of hilar cholangiocarcinoma. *AJR Am J Roentgenol*, 171(3):651-658.

Trusolino L und Comoglio PM. 2002.

Scatter-factor and semaphorin receptors: Cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer*, 2(4):289-300.

Trusolino L, Bertolli A, Comoglio PM. 2010.

MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(12):834-848.

8. Literaturverzeichnis

Tulasne D und Foveau B. 2008.

The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor. Cell Death Differ, 15(3):427-434.

Valls C, Gumà A, Puig I, Sanches A, Andía E, Serrano T, Figueras J. 2000.

Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma: CT evaluation. Abdom Imaging, 25(5):490-496.

van der Merwe JQ, Hollenberg MD, MacNaughton WK. 2008.

EGF receptor transactivation and MAP kinase mediate proteinase-activated receptor-2-induced chloride secretion in intestinal epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 294(2):441-451.

Varnholt H, Asayama Y, Aishima S, Taguchi K, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. 2002.

C-met and hepatocyte growth factor expression in combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. Oncol Rep, 9(1):35-41.

Vauthey JN, Pawlik TM, Abdalla EK, Arens JF, Nemr RA, Wei SH, Kenamer DL, Ellis LM, Curley SA. 2004.

Is extended hepatectomy for hepatobiliary malignancy justified? Ann Surg, 239(5):722-730.

Vergnolle N, Wallace JL, Bunnett NW, Hollenberg MD. 2001.

Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. Trends Pharmacol Sci, 23(3):146-152.

Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. 1991a.

Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. Cell, 64(6):1057-1068.

Vu TK, Wheaton VI, Hung DT, Charo I, Coughlin SR. 1991b.

Domains specifying thrombin-receptor interaction. Nature, 353(6345):674-677.

Wang P, Jiang Y, Wang Y, Shyy JY, DeFea KA. 2010.

Beta-arrestin inhibits CAMKKbeta-dependent AMPD activation downstream of protease-activated-receptor-2. BMC Biochem, 11:36. DOI: 10.1186/1471-2091-11-36.

8. Literaturverzeichnis

Weidner KM, Di Cesare S, Sachs M, Brinkmann V, Behrens J, Birchmeier W. 1996.

Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature*, 384(6605):173-176.

Weinbren K und Mutum SS. 1983.

Pathological aspects of cholangiocarcinoma. *J Pathol*, 139(2):217-238.

Welzel TM, McGlynn KA, Hsing AW, O'Brien TR, Pfeiffer RM. 2006.

Impact of Classification of Hilar Cholangiocarcinomas (Klatskin Tumors) on the Incidence of Intra- and Extrahepatic Cholangiocarcinoma in the United States. *J Natl Cancer Inst*, 98(12):873-875.

Wetter AL, Ring EJ, Pellegrini CA, Way LW. 1991.

Differential diagnosis of sclerosing cholangiocarcinomas of the common hepatic duct (Klatskin tumors). *Am J Surg*, 161(1):57-63.

Wetzker R und Böhmer FD. 2003.

Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(8):651-657.

Wilhelm S und Chien DS. 2002.

BAY 43-9006: preclinical data. *Curr Pharm Des* 8(25):2255-2257.

Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC. 1998.

Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(12):6642-6646.

Zarnegar R und Michalopoulos GK. 1995.

The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol*, 129(5):1177-1180.

Zhu H, Naujokas MA, Fixman ED, Torossian K, Park M. 1994.

Tyrosine 1356 in the carboxyl-terminal tail of the HGF/SF receptor is essential for the transduction of signals for cell motility and morphogenesis. *J Biol Chem*, 269(47):29943-29948.

Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. Settmacher der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Jena für die Überlassung des interessanten Themas sowie die Möglichkeit, in einem hervorragendem Forschungslabor zu arbeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Kaufmann, Leiter des Forschungslabors der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie Jena für die hervorragende Betreuung der Arbeit, die wertvollen Tipps und die Unterstützung beim Erstellen der Arbeit sowie die sehr große Geduld, die sicherlich hierbei notwendig war.

Mein herzlicher Dank gilt den Mitarbeiterinnen des Forschungslabors der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie Jena, insbesondere Frau B. Schulze und Frau E. Oswald, für die fachliche Unterstützung und praktischen Hinweise, die harmonische und ausgesprochen familiäre Arbeitsatmosphäre sowie Rat und Tat in allen Lebenslagen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, dafür dass sie mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und ich stets mit ihrer Unterstützung rechnen durfte - und darf.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Alexander Hascher
geb. am: 1. April 1981 in Plauen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schule und Ausbildung:

09/1987 - 06/1992 16. POS „Wilhelm Pieck“ in Plauen
09/1992 - 06/1997 17. Mittelschule „Dr.-Chr.-Hufeland-Schule“ in Plauen
(Realschulabschluss)

09/1997 - 08/2000 Auszubildender zum Fachangestellten für
Bürokommunikation (Landratsamt Vogtlandkreis)

08/2000 - 06/2003 Diesterweg-Gymnasium (Abendgymnasium) in Plauen
Abschluss: Abitur
*der Erwerb des Abiturs am Abendgymnasium erfolgte
zusätzlich zu den folgenden Tätigkeiten:*

09/2000 - 02/2001 Fachangestellter für Bürokommunikation,
Landratsamt Vogtlandkreis
04/2001 - 03/2002 Zivildienst, Gemeindeverwaltung Theuma
09/2002 - 08/2003 Freiwilliges Soziales Jahr, Arbeiterwohlfahrt Reichenbach

Studium:

10/2003 - 06/2010 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-
Universität Jena
Abschluss: Staatsexamen

Anhang

03/2008 - 09/2013 Doktorand im Forschungslabor der Klinik für Allgemein-,
Viszeral- und Gefäßchirurgie (Direktor: Prof. Dr. U.
Settmacher), Universitätsklinikum Jena

Berufliche Laufbahn:

seit 08/2010: Assistenzarzt am Klinikum Obergöltzsch, Rodewisch
Innere Medizin

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Dr. R. Kaufmann, Frau E. Oswald, Frau B. Schulze,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers: